



**Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología**

**SUBCLASIFICACIÓN DE LOS TIPOS MOLECULARES
DE CÁNCER DE MAMA DE ACUERDO A LA
EXPRESIÓN DE MARCADORES
INMUNOHISTOQUÍMICOS Y EVOLUCIÓN**

TESIS DOCTORAL

ALDO REIGOSA YÁNIZ

2013



**Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología**

Don FRANCISCO SANZ RODRÍGUEZ, Doctor en Biología, Profesor Titular de Biología Celular, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid.

Don DAVID HARDISSON HERNÁEZ, Doctor en Medicina, Profesor Titular de Anatomía Patológica, Departamento de Anatomía Patológica, Escuela de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid.

CERTIFICAN

Que Don ALDO REIGOSA YÁÑIZ, Licenciado en Medicina y Cirugía por la Universidad de Carabobo de Valencia, Venezuela, especialista en Anatomía Patológica, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación: **“SUBCLASIFICACIÓN DE LOS TIPOS MOLECULARES DE CÁNCER DE MAMA DE ACUERDO A LA EXPRESIÓN DE MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS Y EVOLUCIÓN”** que cumple, a nuestro juicio, con los requisitos necesarios para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral.

Para que así conste donde proceda, firmamos el presente escrito en Madrid, a xx de marzo de 2013.

Francisco Sanz

David Hardisson

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas e instituciones que hicieron
posible la realización de este trabajo.

A los amigos.

A mi familia.

A la vida.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Histología de la mama normal.....	12
1.2. Clasificación clínica y patológica del cáncer de mama.....	14
1.2.1. Clasificación clínica.....	14
1.2.2. Clasificación patológica.....	15
1.2.3. Grado histológico (GH).....	16
1.3. Clases moleculares del carcinoma de mama.....	17
1.4. Marcadores inmunohistoquímicos utilizados.....	21
1.4.1. Marcadores de la clasificación molecular.....	21
1.4.1.1. Receptores de estrógeno (RE).....	21
1.4.1.2. Receptores de progesterona (RP).....	22
1.4.1.3. Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2).....	22
1.4.2. Marcadores varios.....	23
1.4.2.1. Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).....	23
1.4.2.2. C-Kit.....	24
1.4.2.3. Proteína p63.....	26
1.4.2.4. Survivina.....	27
1.4.2.5. Aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1).....	28
1.4.2.6. CD10.....	28
1.4.3. Marcador de proliferación celular.....	29
1.4.3.1. Ki-67.....	30
1.4.4. Marcadores de filamentos intermedios.....	30
1.4.4.1. Queratinas.....	30
1.4.4.2. Vimentina.....	33
1.4.5. Marcadores de adhesión celular.....	34
1.4.5.1. Cadherina E.....	34
1.4.5.2. Cadherina P.....	36

1.4.5.3. Proteína p120.....	36
1.4.6. Marcadores del citoesqueleto celular.....	37
1.4.6.1. Actina.....	37
1.4.6.2. Calponina.....	38
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	39
2.1. Hipótesis.....	40
2.2. Objetivos.....	40
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	41
3.1. Sujetos del estudio.....	42
3.2. Definición de variables clínico-patológicas.....	43
3.3. Método inmunohistoquímico de la expresión proteica.....	44
3.3.1. Construcción de la matriz de tejidos.....	44
3.3.2. Inmunohistoquímica.....	45
3.3.3. Método de hibridización <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	47
3.3.4. Interpretación de los resultados del estudio inmunohistoquímico.....	47
3.4. Análisis estadístico.....	50
4. RESULTADOS.....	51
4.1. Análisis descriptivo.....	52
4.1.1. Variables clínico-patológicas.....	52
4.1.2. Clases moleculares.....	52
4.1.3. Análisis de la expresión de diferentes marcadores por inmunohistoquímica.....	53
4.2. Análisis de la relación de las variables clínico-patológicas con las clases moleculares.....	59
4.3. Análisis de la relación de los marcadores analizados por inmunohistoquímica con las clases moleculares.....	60
4.4. Análisis de la supervivencia de la serie.....	64
4.4.1. Análisis de la supervivencia en relación a las variables clínico- patológicas.....	64
4.4.2. Análisis de la supervivencia en relación a la expresión de los marcadores moleculares analizados.....	66
4.4.2.1. Marcadores varios y de proliferación celular.....	66
4.4.2.2. Filamentos intermedios.....	67

4.4.2.3. Marcadores de adhesión celular y citoesqueleto.....	67
4.4.3. Análisis de la supervivencia en relación a las clases moleculares.....	68
4.4.4. Análisis de la supervivencia en relación a las variables clínico-patológicas y la clase molecular.....	69
4.4.5. Análisis de la supervivencia en relación a la expresión de los marcadores moleculares analizados por inmunohistoquímica y la clase molecular.....	70
4.4.5.1. Análisis de la supervivencia en relación a la expresión de marcadores varios y la clase molecular.....	70
4.4.5.2. Análisis de la supervivencia en relación a la expresión de diferentes filamentos intermedios y la clase molecular.....	72
4.4.5.3. Análisis de la supervivencia en relación a la expresión de marcadores de adhesión celular y citoesqueleto con la clase molecular.....	73
4.4.6. Análisis de la supervivencia en relación a la expresión de los marcadores moleculares analizados por inmunohistoquímica y los subtipos de las clases moleculares.....	74
4.4.6.1. Clase Luminal A.....	74
4.4.6.2. Clase Luminal B.....	75
4.4.6.3. Clase HER2.....	79
4.4.6.4. Clase Triple Negativo.....	81
4.5. Análisis multivariante.....	83
5. DISCUSIÓN.....	85
5.1. Clases moleculares.....	86
5.2. Variables clínico-patológicas.....	87
5.3. Marcadores y heterogeneidad tumoral.....	89
5.3.1. Marcadores varios y de proliferación celular.....	92
5.3.2. Marcadores de filamentos intermedios.....	95
5.3.3. Marcadores de adhesión celular y del citoesqueleto.....	97
5.4. Clase molecular Luminal A y subtipos.....	99
5.5. Clase molecular Luminal B y subtipos.....	100
5.6. Clase molecular HER2 y subtipos.....	101
5.7. Clase molecular Triple Negativo (TN) y subtipos.....	102

6. CONCLUSIONES.....	106
7. BIBLIOGRAFÍA.....	108

ABREVIATURAS

GH	=	Grado histológico
HER2	=	Receptor del factor de crecimiento epidérmico 2
RE	=	Receptores de estrógeno
RP	=	Receptores de progesterona
CK	=	Citoqueratina
TN	=	Triple negativo
TNB	=	Triple negativo basal
TNnB	=	Triple negativo no basal
EGFR	=	Receptor del factor de crecimiento epidérmico 1
TKI	=	Tirosina quinasa
PDGF	=	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
SCF	=	Factor de célula madre
GIST	=	Tumor del estroma gastrointestinal
TA	=	Dominio transactivador
IAP	=	Proteínas inhibidoras de la apoptosis
ALDH	=	Aldehído deshidrogenasa
CALLA	=	Antígeno común de leucemia linfoblástica aguda
TEM	=	Transición epitelio mesenquima
CaP	=	Calponina
IOMPC	=	Instituto de Oncología “Dr. Miguel Pérez Carreño”
TMA	=	Matrices de tejido
APM	=	Alto peso molecular
MI	=	Músculo liso
FISH	=	Hibridización <i>in situ</i> fluorescente
Cad	=	Cadherina
SG	=	Supervivencia global
EC	=	Estadio clínico
IHQ	=	Inmunohistoquímica

RESUMEN

Los carcinomas de la mama se han clasificado recientemente desde el punto de vista molecular en cuatro grupos mayores, que presentan un pronóstico y tratamiento muy diferentes. Estas clases moleculares son: Luminal A, Luminal B, HER2 y triple negativo (TN). Sin embargo, estos grupos no son homogéneos y existe la necesidad de establecer subcategorías que puedan ser identificadas mediante inmunohistoquímica (IHQ), para así predecir mejor su pronóstico y llevar a cabo un tratamiento más efectivo. El presente estudio se realizó en 354 pacientes diagnosticadas de carcinoma ductal infiltrante de mama en seguimiento en el Instituto de Oncología “Dr. Miguel Pérez Carreño” de Valencia, Venezuela. Se analizó la expresión de 22 moléculas por matrices de tejidos y se compararon los resultados obtenidos con las clases moleculares definidas por IHQ, de acuerdo a la expresión de receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (RP) y HER2, y con la supervivencia global. De este análisis se obtuvo que en la clase molecular Luminal A se pueden establecer varios subgrupos de significado pronóstico: el subgrupo con expresión exclusiva de RE y RP, con Ki-67 $\leq 14\%$, con mejor pronóstico, y el subgrupo de Luminal A con Ki-67 $>14\%$, o con expresión de otros marcadores relacionados con el fenotipo basal. El grupo Luminal B puede ser dividido en subtipos de acuerdo a la expresión de Ki-67 (punto de corte en el 25%) y de acuerdo a la expresión de cadherina P. En la clase HER2, parece importante el índice de Ki-67 para el pronóstico (punto de corte en 25 %). La clase de TN puede ser dividida según el índice de proliferación en dos categorías pronósticas, con un mejor pronóstico para aquellos tumores con un índice de Ki-67 $\leq 25\%$. La combinación de CK5/6, EGFR, vimentina y cadherina P detecta a la gran mayoría de los casos TN basales (TNB). Las clases moleculares mayores del carcinoma de mama reconocidas han demostrado su valor pronóstico.

ABSTRACT

Breast cancer has been recently classified molecularly into four major groups that have different prognosis and therapy. These molecular classes are: Luminal A, Luminal B, HER2 and triple negative (TN). Nevertheless, these groups are not homogeneous and there is the need to establish subtypes that could be identified through immunohistochemistry (IHC), to improve their prognosis and apply a more effective treatment. The present study was performed in 354 patients diagnosed with breast infiltrating ductal carcinoma in the Oncology Institute "Dr. Miguel Pérez Carreño", Valencia, Venezuela. The expression of 22 molecules was analyzed by tissue microarrays and the results were compared with the molecular classes established by IHC, according to the expression of estrogen receptor (ER), progesterone (PR) and HER2, and with the overall survival. From this analysis it was obtained that in Luminal A molecular class there can be established several subtypes of prognosis significance: the subgroup with expression only of ER y PR, with Ki-67 $\leq 14\%$, that have a better prognosis, and the subgroup Luminal A with Ki-67 $> 14\%$, or with expression of other markers related with the basal phenotype. The Luminal B type can be subdivided according to the expression of Ki-67 (25% cut point) and the expression of P cadherin. In the HER2 type it seems important for prognosis the Ki-67 index (25% cut point). The TN class can be divided by the proliferative index into two prognostic categories, with a better prognosis for those tumours with a Ki-67 index $\leq 25\%$. The combination of CK5/6, EGFR, vimentin and P cadherin detects most of basal TN (TNB) cases. The major molecular classes of breast carcinomas recognized have shown prognosis value.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama representa un problema de salud pública en muchos países desarrollados y en vías de desarrollo. Considerando los dos sexos, es el segundo en frecuencia en el mundo después del cáncer de pulmón. Más de la mitad de los casos se diagnostican en los países desarrollados: 370.000 casos al año en Europa (27,4%) y 230.000 en Norteamérica (31,3%). En la Unión Europea la probabilidad de desarrollar un cáncer de mama antes de los 75 años es del 8%. La prevalencia más baja la tienen países como Japón, Tailandia, Nigeria e India. Se estima que el riesgo de padecer cáncer de mama es de 1 de cada 8 mujeres (1,2).

El cáncer de mama fue la causa de 5.727 muertes en España en el año 2005, constituyendo la causa de mortalidad por cáncer más frecuente en mujeres. En Venezuela, se registraron 1.463 defunciones por esta patología en el año 2007, siendo la segunda en frecuencia en mujeres, detrás del cuello uterino. Mientras que el número de casos y las tasas de incidencia aumentan lentamente, el número de muertes está estabilizado en muchos países desarrollados, y las tasas de mortalidad descienden, debido sobre todo a un mejor resultado de los tratamientos y a la detección precoz de esta neoplasia (3).

En términos generales, se ha observado un aumento global de la incidencia del cáncer de mama, lo que pudiera ser debido al desarrollo de campañas más intensas de detección. Sin embargo, existen evidencias de que se está produciendo un incremento real, cuyos motivos son en gran parte desconocidos. Hay referencias que responsabilizan de este aumento a ciertas razas y poblaciones, como las hispánicas, africanas y asiáticas, mientras que se ha observado una baja en la incidencia en la raza blanca, sobre todo la de origen europeo (4,5).

1.1. Histología de la mama normal

La glándula mamaria consta de tejido epitelial, tejido conjuntivo y tejido adiposo. El tejido

epitelial está formado por dos elementos fundamentales: los acinos glandulares, donde se encuentran las células productoras de leche y los ductos, un conjunto de estructuras tubulares y huecas, ramificadas en forma de árbol, cuyas luces confluyen en canalículos de un calibre progresivamente mayor hasta terminar en uno de los doce a veinte vértices llamados senos lactíferos. Estos últimos son dilataciones ductales a modo de reservorios situados inmediatamente por detrás del pezón (Figura 1), revestidos por un epitelio escamoso no queratinizado (6).

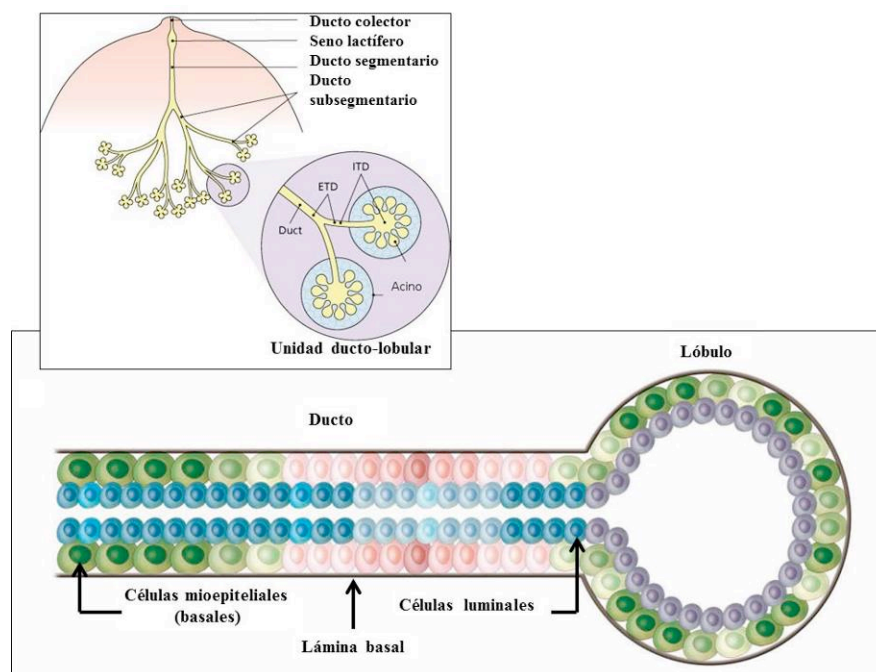


Figura 1. Esquema del componente epitelial de la mama.
(modificado de Korsching)(7)

Desde la semana 28 de vida intrauterina el epitelio de la mama humana está formado por dos capas de células, una capa interna luminal y una capa externa, yuxtapuesta a la membrana basal, llamada mioepitelial (Figura 1). Esta capa de células mioepiteliales es morfológicamente heterogénea en cuanto a que las células pueden ser fusiformes o cuboidales, dependiendo de su localización en la estructura ramificada de los ductos mamarios y del estado hormonal del tejido. Estas células presentan características

inmunofenotípicas variadas, incluyendo expresión de actina de músculo liso (SMA), miosina y endopeptidasa neutral (CD10), entre otras. El término de célula mioepitelial se impuso para describir células con características tanto epiteliales como con proteínas contráctiles (6,7).

1.2. Clasificación clínica y patológica del cáncer de mama

En cáncer de mama existen dos tipos de clasificaciones que es imprescindible conocer: una es la clasificación clínica TNM y la otra es la clasificación patológica de los tumores (8).

1.2.1. Clasificación clínica

Se basa en el sistema TNM. La letra **T** seguida de un número entre 0 y 4 indica el tamaño del tumor y la propagación a la piel o al tórax debajo de la mama. A mayor número, mayor tamaño del tumor y/o mayor propagación a tejidos circundantes. La letra **N**, seguida de un número de 0 a 3 e indica si el tumor se ha extendido a ganglios linfáticos cercanos a la mama y en caso afirmativo si éstos se han adherido a otras estructuras. La letra **M** seguida de un número de 0 a 1 indica si el tumor se ha extendido a órganos distantes. En base a lo anterior se establece el estadio clínico o extensión de la enfermedad al momento del diagnóstico. El pronóstico y tratamiento dependerá en gran medida de este estadio, que se expresa mediante números romanos, de I a IV. Una vez realizados los exámenes para determinar el TNM, se establece el estadio clínico (Tabla 1).

De una manera simple se puede resumir que los dos primeros estadios corresponden a situaciones potencialmente operables de inicio y los dos últimos corresponden a situaciones inoperables, que deben ser sometidas a quimioterapia previa y una nueva evaluación o estadiaje, para una reconsideración del arsenal terapéutico. El pronóstico empeora a medida que los estadios aumentan. Así en las estadísticas generales se ve que la supervivencia a los 5 años para el Estadio I es del 86%, para el Estadio II es del 58%, para el Estadio III es del 46%, y para el Estadio IV disminuye al 12%. En los países desarrollados se ha observado un

incremento en el diagnóstico de tumores en estadios tempranos (estadios I y II), que representan aproximadamente el 75% de la totalidad de los casos que se diagnostican; esta realidad es muy diferente en Venezuela y otros países llamados en vías de desarrollo, donde el mayor porcentaje de los diagnósticos de cáncer de mama se realiza en estadios avanzados (estadios III y IV) (1,2,8).

Estadio clínico		TNM	
I	- T1	N0	M0
II	- T0	N1	M0
	- T1	N1	M0
	- T2	N0	M0
	- T2	N1	M0
	- T3	N0	M0
III	- Cualquier T	N2-3	M0
	- Cualquier T3-4	con cualquier N	M0
IV	- Cualquier T	con cualquier N	M1

Tabla 1. Determinación del estadio clínico de acuerdo al TNM

1.2.2. Clasificación patológica

Se basa en la célula de origen de la neoplasia: tumores epiteliales; tumores mioepiteliales; tumores mesenquimales; tumores fibroepiteliales y otros. Los más frecuentes son los de origen epitelial (carcinomas), que a su vez pueden ser infiltrantes o no infiltrantes. El carcinoma ductal infiltrante sin otra especificación es el tipo histológico más frecuente y comprende en algunas series hasta el 75% de los casos diagnosticados (8). En la Tabla 2 se señalan las variedades histológicas más frecuentes.

Carcinoma	Tipos
No infiltrante	<ul style="list-style-type: none"> - Carcinoma intraductal (carcinoma ductal <i>in situ</i>) - Carcinoma lobulillar <i>in situ</i>
Infiltrante	<ul style="list-style-type: none"> - Carcinoma ductal infiltrante sin otra especificación - Carcinoma lobulillar infiltrante - Carcinoma tubular - Carcinoma cribiforme - Carcinoma medular - Carcinomas con abundante mucina - Carcinomas neuroendocrinos - Carcinoma papilar infiltrante - Otros 11 subtipos menos frecuentes.

Tabla 2. Tipos histológicos del carcinoma de la mama

1.2.3. Grado histológico (GH)

Los carcinomas infiltrantes de la mama se dividen morfológicamente de acuerdo a su patrón de crecimiento y grado de diferenciación. Este último refleja cuán parecidas son las células tumorales a las células epiteliales normales de la mama. Esta subdivisión se realiza a través del tipo histológico y el grado histológico. Aunque el tipo de tumor proporciona información pronóstica útil, la mayoría de los carcinomas de mama (60 a 75%) no tienen características especiales; aquellos tipos que muestran significado pronóstico propio son relativamente infrecuentes. Como consecuencia, el papel del tipo histológico en el manejo clínico de la paciente es limitado (9).

El GH se basa en el grado de diferenciación del tejido tumoral. En el cáncer de mama, se refiere a la evaluación semi-cuantitativa de las características morfológicas y es un método simple y de bajo costo, requiriendo sólo una adecuada preparación histológica coloreada con hematoxilina-eosina, evaluada por un patólogo apropiadamente entrenado con el uso de un

protocolo estándar. Se fundamenta en la evaluación de tres parámetros morfológicos: a) grado de formación tubular o glandular, b) pleomorfismo nuclear y c) número de mitosis. El resultado es la gradación en tres categorías, correspondiendo el GH I a los tumores bien diferenciados y el GH III a los pobremente diferenciados (8-10). A este grado histológico se le añadió posteriormente el estado de los ganglios linfáticos axilares, para dar origen al índice pronóstico de Nottingham (11).

1.3. Clases moleculares del carcinoma de mama

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea que presenta una variabilidad sustancial en la evolución de la enfermedad dentro de cada categoría. Generalmente se acepta que los cursos clínicos variados de pacientes con tumores histológicamente idénticos, son el resultado de diferencias moleculares. Se deduce que el análisis molecular detallado del cáncer pudiera aportar información que mejoraría la predicción pronóstica (12).

Perou y col. (13) y Sorlie y col. (14) fueron los primeros en mostrar que los carcinomas mamarios pueden también subdividirse en base al análisis de la expresión génica. Estos estudios determinaron que existían al menos cuatro clases moleculares de cáncer de mama denominadas tipo luminal, tipo basal, tipo parecido a mama normal y tipo HER2 (receptor del factor de crecimiento epidérmico 2) positivo. Estudios subsiguientes confirmaron que hay diferencias de gran magnitud en la expresión génica entre los cánceres con receptores de estrógeno (RE) positivos (principalmente de tipo luminal) y RE-negativos (predominantemente de tipo basal) (15-17). El pronóstico y sensibilidad a la quimioterapia de los subgrupos moleculares es diferente. El tipo luminal tiende a tener mejor pronóstico que los otros, mientras los tumores tipo basal y HER2 positivos son de peor pronóstico (14,18). Cuando se interpretan estas observaciones, es importante tener en mente que muchas de estas correlaciones son esperadas debido a la fuerte asociación entre las clases moleculares y las

variables histopatológicas clásicas. Por ejemplo, en un trabajo de Rouzier y col. (18), todos los carcinomas de tipo luminal fueron RE-positivos y el 63% de ellos eran de grado histológico bajo o intermedio (GH I o II), mientras el 95% de los carcinomas de tipo basal eran RE negativos, y el 91% de ellos eran de alto grado histológico (GH III). Estas asociaciones pueden explicar la razón por la que los carcinomas de tipo basal tienen peor pronóstico que los de tipo luminal a pesar de su mayor sensibilidad a la quimioterapia. Los carcinomas de tipo luminal son RE positivos y de bajo GH y, por tanto, sensibles a la terapia endocrina, y tienen un pronóstico más favorable que los carcinomas de tipo basal RE negativos y de alto GH, aún en ausencia de cualquier terapia. Sin embargo, no todos los carcinomas luminales se comportan homogéneamente, demostrando así que la realidad biológica es compleja (11,12).

A pesar de estos resultados, hay grandes limitaciones en la capacidad de asignar consistentemente una clase molecular a nuevos casos de cáncer de mama. Es necesario un método predictivo estandarizado de clases moleculares. Igualmente, se desconoce con exactitud cuantas clases moleculares de cáncer de mama hay. Los primeros trabajos de Perou y col. (13), con algoritmos de agrupamiento jerárquico, utilizaron 1.753 genes. Posteriormente, la lista de genes fue modificada y se usaron 476 genes, llamados el “set de genes intrínsecos”, que sugirieron subgrupos adicionales en la categoría del tipo luminal, luminal A, luminal B y luminal C (14). En un tercer estudio de los mismos investigadores, con una versión modificada del set de genes intrínsecos, utilizando en este caso 534 genes, se observó nuevamente a los tipos basal, parecido a mama normal, HER2 positivo, y dos categorías de cánceres de tipo luminal, A y B. El tipo parecido a mama normal fue descartado posteriormente de las clases moleculares, al comprobarse que representaba características de tejido normal de la mama y no tejido tumoral (16).

Los resultados de agrupamiento dependen del set de genes utilizados, y es importante usar un grupo de genes estándar, ya que de otra manera los agrupamientos podrían dar lugar a resultados diferentes, aún para los mismos datos. Los algoritmos de agrupamiento funcionan uniendo primero los dos especímenes más parecidos, y luego sucesivamente fusionando otros especímenes de acuerdo a su similitud. Por tanto, cuando se suman casos nuevos al set de datos existentes, el orden previo de agrupamiento se revisa, y se genera un dendograma completamente nuevo. Parece evidente que es necesario desarrollar un método estandarizado con grandes bases de datos para definir las clases moleculares de cáncer de mama (12).

En relación a la predicción de la respuesta a la quimioterapia, hay ejemplos de investigaciones exitosas en este sentido. Se ha desarrollado un modelo predictivo del pronóstico en base a 70 genes en 78 cánceres de mama, seleccionados en dos grupos iguales, con o sin recaída tumoral en 5 años (19). Esta predicción del pronóstico general se ha validado en series independientes (20). Otros investigadores tomaron una aproximación diferente e identificaron genes que fueron asociados con la recaída, separadamente para los subgrupos de pacientes RE-negativos y RE-positivos. Los marcadores que fueron seleccionados para cada grupo fueron entonces combinados para formar una huella pronóstica de 76 genes (21). Este modelo de predicción también funcionó bien cuando se probó en 180 casos independientes, creándose sistemas comerciales que han probado su utilidad para seleccionar ciertos tipos de carcinoma, que responden favorablemente a una terapia específica (22-25).

Sin embargo, con las nuevas tecnologías, también surgen nuevos retos. Debe determinarse la reproducibilidad de los resultados intra e interlaboratorios, y la estandarización de la metodología establecida. Es necesario, además, definir la sensibilidad de la predicción de resultados en base a los métodos de adquisición de tejidos, manejo de muestras, y variables

relacionadas con la metodología empleada como parte de un proceso de evaluación clínica (26).

Una forma de realizar la clasificación molecular del cáncer de mama es mediante el análisis de expresión génica, sin embargo, la mayoría de los especímenes clínicos archivados no permiten este tipo de análisis, su alto costo y la falta de disponibilidad en muchos países ha determinado el empleo de otras técnicas, como el uso de inmunohistoquímica. Diferentes estudios comparando resultados obtenidos mediante el uso de micromatrices de expresión génica e inmunohistoquímica (IHQ) para RE, RP y HER2 han demostrado una buena correlación, superior al 92%. Sin embargo, no existe un acuerdo unánime respecto a cuáles son los marcadores inmunohistoquímicos más apropiados para definir las diferentes categorías moleculares (27-29).

En los últimos años se ha avanzado mucho en la comprensión del origen del carcinoma de mama. La teoría de las células madre cancerosas, los mecanismos de la transformación epitelio-mesénquima y el papel de las células mioepiteliales han aportado información muy valiosa en este sentido y han ayudado a entender mejor el carácter heterogéneo de la enfermedad (30-34). Sin embargo la prevalencia exacta y las características clinicopatológicas de los tumores que co-expresan citoqueratinas (CKs) basales y luminales es desconocida. Igualmente, el grado de diferenciación y las características funcionales de las células epiteliales que originan el carcinoma de mama aún no se conocen.

La heterogeneidad del carcinoma de mama es un hecho bien reconocido y aceptado. Puede explicarse por su origen de células madre cancerosas con potenciales evolutivos diferentes y un significativo número de diferentes alteraciones genéticas posibles (35,36).

Como se ha comentado previamente, numerosos trabajos han confirmado la utilidad de las clases moleculares en cuanto a su capacidad de predecir la evolución y la respuesta a diferentes tratamientos en el cáncer de mama. Sin embargo, es evidente que esas clases

moleculares no son grupos homogéneos y que existen grupos híbridos o subtipos con importancia pronóstica y terapéutica, que pueden definirse mediante la inmunohistoquímica. Actualmente, desde el punto de vista inmunohistoquímico, se reconocen las clases moleculares Luminal A, Luminal B, HER2 y Triple Negativo (TN), subdividiéndose esta última clase a su vez en tipo TN basal (TNB) y TN no basal (TNnB), de acuerdo a la expresión de marcadores característicos de células basales tales como la CK5/6, p63, el receptor del factor de crecimiento epidérmico 1 (EGFR) y otros (37-42).

1.4. Marcadores inmunohistoquímicos utilizados

1.4.1. Marcadores de la clasificación molecular

1.4.1.1. Receptores de estrógeno (RE)

El RE es un factor predictivo muy importante en cáncer de mama. Cerca de dos tercios de los carcinomas de mama en mujeres menores de 50 años expresan RE (RE+) y aproximadamente, el 80% de los tumores en mujeres mayores de 50 años son RE+. Esto tiene implicaciones terapéuticas significativas. El RE es importante en el proceso carcinogénico, y su inhibición, a través de tratamientos hormonales, ya sea directamente usando agonistas estrogénicos o indirectamente bloqueando la conversión de andrógenos a estrógenos, constituyen la principal terapia adyuvante en cáncer de mama. Los tumores de mama que son RE+ y/o receptores de progesterona (RP) positivos (RP+) tienen un riesgo de mortalidad inferior comparado a los tumores RE negativos (RE-) y/o RP negativos (RP-) y son factores pronósticos independientes de cualquier otra característica tumoral clínica, además de su utilidad terapéutica antes indicada. El estrógeno ejerce sus efectos biológicos por la vía de los REs, que son proteínas nucleares y de las cuales se conocen dos subtipos, RE alfa (RE α) y RE beta (RE β). Ambos son factores de transcripción que median la acción de los estrógenos, unen estradiol en la misma extensión, pero difieren en su afinidad con la que unen otros

ligandos y en la respuesta que subsecuentemente producen. El RE α se expresa en cerca del 70% de todos los cánceres de mama; sin embargo, su poder predictivo no es absoluto, ya que aproximadamente un tercio de los carcinomas de mama metastásicos no responden a la terapia hormonal. Mucho menos se conoce sobre la función del RE β y la mayoría de los datos disponibles pertenecen al RE α (43).

1.4.1.2. Receptores de progesterona (RP)

El RP es regulado por el gen RE; se piensa por tanto que su expresión indica una vía de funcionamiento del RE; la determinación de RP está, por tanto, condicionada a la expresión del RE. Los tumores positivos tanto para RE como para RP responden mejor al tamoxifén, tanto en pacientes con enfermedad metastásica como en terapia adyuvante. El valor predictivo de la positividad a RP en ausencia de RE es controvertido, con algunos datos que sugieren que RP positivo, aún en ausencia de RE, identifica a un grupo de pacientes que responden mejor a la terapia hormonal, aunque este hecho no está universalmente aceptado (43).

1.4.1.3. Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2)

El gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) codifica para un miembro de la familia de tirosina quinasas del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y se localiza en el cromosoma 17q21. Es importante para la diferenciación, adhesión y motilidad celular. La amplificación es el principal mecanismo de la sobreexpresión del gen y se observan altos niveles anormales de la glucoproteína de 185-kDa en aproximadamente 15-20% de los carcinomas de mama. La sobreexpresión de HER2 está asociada a tumores de alto grado histológico, compromiso de ganglios linfáticos, un mayor porcentaje de recidiva y mortalidad más elevada debido a la enfermedad, y por tanto, a un peor pronóstico. El estado de HER2 es un factor predictivo de respuesta al trastuzumab. La determinación del estado de

HER2 se realiza rutinariamente en todos los carcinomas de mama inicialmente mediante inmunohistoquímica (43).

1.4.2. Marcadores varios

1.4.2.1. Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

El EGFR es un miembro de la familia EGFR/ErbB/HER de receptores tipo I de tirosina quinasas de transmembrana codificado en el cromosoma 7p12 (44). Estos receptores juegan un papel esencial en el desarrollo de los órganos y crecimiento, regulando tanto la diferenciación y morfología de las células y tejidos. La expresión aberrante y los eventos de señalización que esta sobreexpresión produce inducen un desarrollo equivocado y una proliferación no restringida en un buen número de tumores humanos incluyendo el cáncer de mama (45). La activación de EGFR inevitablemente involucra la homo o heterodimerización del EGFR con otra molécula EGFR u otro miembro de la familia de ErbB (por ejemplo HER2), que a su vez induce la cascada de señalización amplificada. La actividad amplificada de EGFR y/o HER2 eventualmente resultará en una proliferación incontrolada, una característica de las células cancerosas. Adicionalmente, las células que sobreexpresan EGFR o muestran una activación anómala de EGFR pueden tener una apoptosis reducida, así como una capacidad de metástasis y de angiogénesis aumentada. La sobreexpresión de EGFR está presente en grupos de carcinomas de mama con mal pronóstico (46).

EGFR puede dividirse en dos subestructuras funcionales. La primera consiste en el ectodominio extracelular responsable del enlace con el ligando, la dimerización y la iniciación de la transducción de señales (Figura 2). Este ectodominio ha sido el blanco principal de la terapia anti-EGFR, con el desarrollo de anticuerpos monoclonales dirigidos a la región de enlace con el ligando, que desactiva al EGFR mediante un mecanismo de inhibición competitiva y por provocar la disminución en la expresión general del EGFR a través del aumento de la internalización del receptor. La segunda mayor subestructura

funcional de EGFR es el dominio de tirosina quinasa situado del lado intracelular de la membrana plasmática. Este dominio desempeña un papel clave en la activación de la cascada de señalización involucrada en la proliferación, división y diferenciación celular; por tanto, la inhibición de la actividad enzimática tirosina quinasa del EGFR mediante pequeñas moléculas inhibitorias llamadas TKIs, plantea una opción de tratamiento clínicamente relevante para los pacientes con cáncer de mama (46).

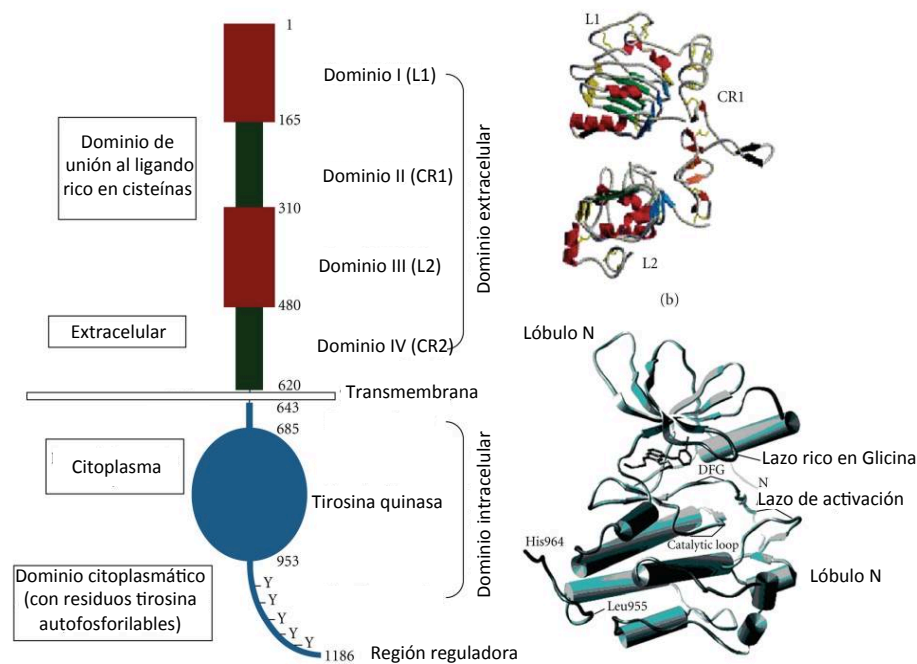


Figura 2. Representación esquemática de la estructura del EGFR (tomada de Flynn)(46).

1.4.2.2. C-Kit

La proteína de transmembrana C-Kit es un receptor tirosina quinasa estrechamente relacionado a otros receptores incluyendo el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el receptor del factor de crecimiento de macrófagos (MCSF). El principal ligando de C-Kit es el factor de células madre (stem cell factor-SCF) (47). La unión de SCF a C-Kit causa dimerización, autofosforilación y transducción de señal (Figura 3). El sistema de señalización SCF-C-Kit sustenta o mantiene la proliferación, diferenciación y supervivencia

de las células que expresan C-Kit, tales como las células hematopoyéticas progenitoras, células cebadas, melanocitos, células germinales primordiales de ovarios y testículos, y células intersticiales de Cajal del tracto gastrointestinal. C-Kit se expresa en células normales, neoplasias hematológicas y tumores sólidos como el carcinoma de células pequeñas del pulmón, el cáncer colorrectal o el sarcoma de Ewing. Por otro lado, el cáncer de mama y de tiroides se asocian a pérdida de la expresión de C-Kit. En algunos cánceres como el tumor del estroma gastrointestinal (GIST), leucemia mieloide crónica, leucemia de células cebadas y otros se observan mutaciones en *C-KIT*. Las mutaciones en *C-KIT* pueden dar lugar a la activación del receptor en ausencia de ligando. Algunas mutaciones de *C-KIT* se asocian con mayor frecuencia a recaídas y a una menor supervivencia (47, 48). La expresión de C-Kit se ha descrito en un rango de 1 a 25% de los carcinomas de mama, y se ha relacionado con un peor pronóstico (49).

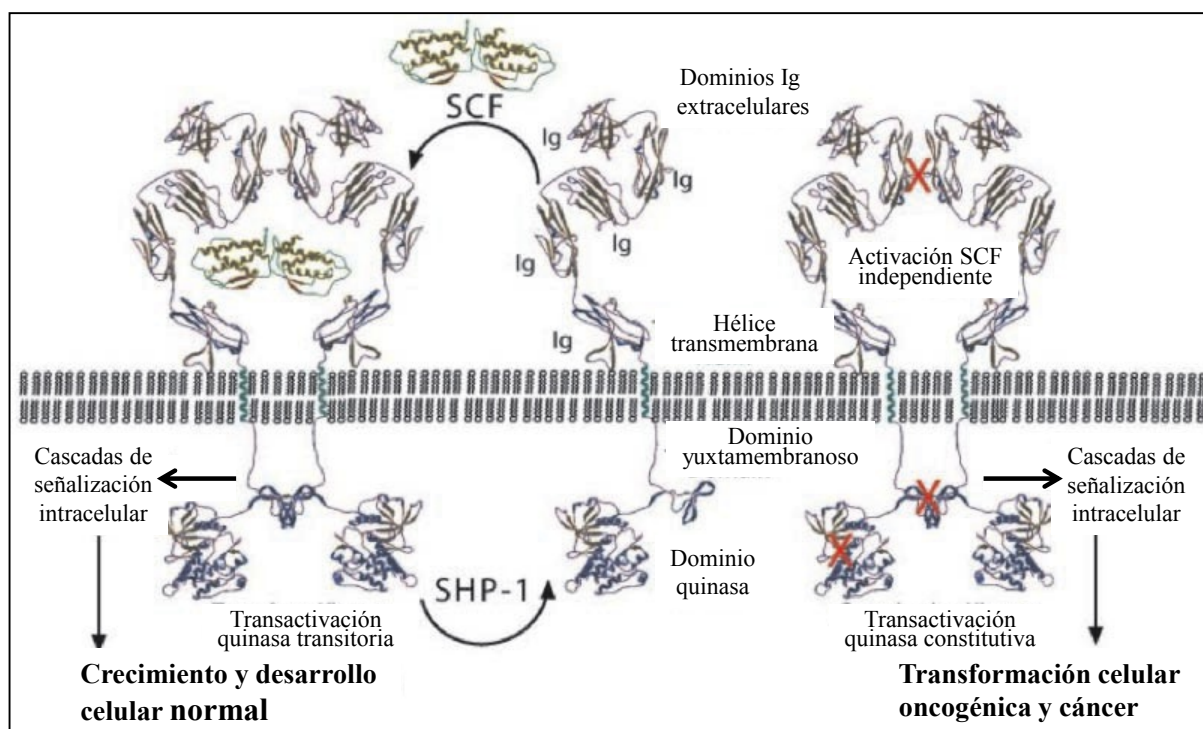


Figura 3. Representación esquemática de la estructura y función de C-Kit en condiciones normales y en el cáncer (tomada de Mol) (48). **SCF** = receptor del factor de célula madre.

SHP = proteín-tirosin fosfatasa

1.4.2.3. Proteína p63

Yang y col. (50) describieron un locus en la posición 3q27 del cromosoma 29 que codifica un gen homólogo al de *TP53* que llamaron *p63*. La proteína p63 pertenece a la familia de supresores tumorales p53. Esta proteína tiene la capacidad de actuar como factor de transcripción, regulando la progresión del ciclo celular, manteniendo la capacidad proliferativa o induciendo apoptosis, en función del estímulo ambiental recibido por la célula. Se encuentra expresado principalmente en las células de la capa basal del epitelio escamoso estratificado y del epitelio de transición. Se expresa intensamente en el núcleo de las células basales de la epidermis, cuello uterino, vagina, urotelio, mucosa bronquial, glándulas prostáticas y células mioepiteliales de la glándula mamaria. Por otro lado, se expresa también en algunos carcinomas ductales infiltrantes y, más raramente, en el carcinoma *in situ* (51,52). El gen p63 codifica seis isoformas de proteína, tres con un dominio N-terminal transactivador (TA) y tres isoformas dominantes negativas (δ N) sin el dominio TA N-terminal (Figura 4). La isoforma δ N-p63 puede participar en un mecanismo alternativo para sobrepasar el arresto del ciclo celular y la apoptosis, relacionado con p53, constituyendo así un mecanismo eficiente para mantener una población de células basales. Mientras que las isoformas trans-activadas tienen acciones similares a p53, las N-isoformas inhiben la activación transcripcional por p53. Las isoformas trans-activadas se expresan en el epitelio estratificado y en células basales de la próstata y glándulas salivales. En el epitelio mamario normal, p63 se expresa únicamente en la capa de células mioepiteliales (53,54).

La expresión inmunohistoquímica de p63 se ha encontrado en un 10-12% de los tumores mamarios y se asocia con un alto grado histológico, gran tamaño tumoral, metástasis ganglionares linfáticas y RE-. Sin embargo, con los datos actuales no queda clara la asociación entre la expresión de p63 y el pronóstico y progresión tumoral en el cáncer de mama (55).

señalización de Stat3 y la expresión de survivina en células tumorales de la mama tienen el potencial de inducir apoptosis y sensibilizar al tumor a la quimioterapia (57).

Entre las moléculas candidatas a controlar la viabilidad de las células madre está la survivina (58). Consistente con este patrón de expresión onco-fetal, la survivina es esencial para la homeostasis tisular y estudios condicionales de *knockout* han sugerido un importante papel en esta vía en el mantenimiento de la viabilidad de las células madre, al menos en ciertos compartimientos celulares (57,58).

1.4.2.5. Aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1)

ALDH1 es una isoforma citosólica de una enzima codificada por el gen *ALDH1A1* en el cromosoma 9q21. ALDH1 pertenece a la superfamilia de las aldehído deshidrogenasas responsables de la oxidación de aldehídos a sus correspondientes ácidos carboxílicos. Se expresa ampliamente durante el desarrollo tisular normal y la homeostasis y también se encuentra en células del sistema inmune. Además, la expresión de ALDH1 se encuentra alterada en tumores malignos comparada con sus respectivos tejidos normales (59).

En la mama, la expresión de ALDH1 es considerada un marcador tanto de células madre progenitoras normales como de células malignas. En cánceres mamarios establecidos, la expresión de ALDH1 se ha asociado a una evolución desfavorable y resistencia a la quimioterapia (60,61). Las células ALDH1 positivas son más frecuentes en los tumores de tipos basal y HER2 que en los luminales (36,61).

1.4.2.6. CD10

CD10, llamado también Antígeno Común de Leucemia Linfoblástica Aguda, fue originalmente descrito como un antígeno asociado a leucemia que se expresaba en las células precursoras y germinales linfoides B, y es un marcador útil en la categorización de leucemias agudas y linfomas. Posteriormente, la expresión de este marcador se demostró en un amplio rango de tejidos no hematopoyéticos, incluyendo células glomerulares del riñón, células

epiteliales de la próstata e intestino delgado y grueso, células estromales del endometrio y células mioepiteliales de la mama. CD10 es un marcador de superficie de células mioepiteliales que se expresa durante la maduración de la mama. La expresión de CD10 disminuye en el carcinoma intraductal y se pierde normalmente en el carcinoma infiltrante de mama de tipo luminal, observándose con mayor frecuencia asociado a los carcinomas de tipo basal y por tanto a un peor pronóstico (62).

1.4. 3. Marcador de proliferación celular

1.4.3.1. Ki-67

El antígeno Ki-67 es una proteína nuclear que se expresa en las fases activas del ciclo celular: G2, S y M, de todas las células que se encuentran en proliferación, no siendo detectable en la fase G0 ni en la primera etapa de G1. En relación a su estructura, es una proteína no histona que está codificada por un gen de 15 exones localizado en el brazo largo del cromosoma 10 (10q25) (63). El centro de este gen está formado por un exón de 6845 bp que contiene 16 segmentos homólogos repetidos de 366 bp, denominado "*Ki67 repeats*". Cabe señalar que esta proteína se expresa con cierta variación en la fase G1, es indetectable en la transición temprana de G0 a G1 y en la primera fase de G1T y G1A, pero siempre será positiva en una fase posterior del ciclo celular. Se ha sugerido que esta peculiaridad en la expresión del antígeno se debe a que la primera transición de G0 a G1 es una secuencia de iniciación de proliferación y no pertenece a ninguna fase del ciclo celular (64).

Se ha descubierto que Ki-67 constituye una proteína que mantiene la proliferación celular y se ha convertido en un valioso instrumento en la detección y evaluación de células tumorales. La evaluación de la expresión del antígeno Ki-67 se realiza mediante inmunohistoquímica (65).

El índice de proliferación basado en la expresión del antígeno Ki67 es un indicador que expresa proliferación tumoral mediante una evaluación cuantitativa de la positividad de Ki67

contenida en una muestra histopatológica. Por tanto, es de gran importancia en la predicción de la evolución clínica del cáncer de mama, puesto que mientras más elevado es el índice de Ki-67, mayor será la fracción de células tumorales en proliferación y la agresividad del tumor, lo cual se relaciona con un pronóstico más sombrío (38, 39, 66).

1.4.4. Marcadores de filamentos intermedios

1.4.4.1. Queratinas

Las citoqueratinas (CKs) son proteínas filamentosas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto celular (Figura 5), en particular, de las células epiteliales (incluyendo mucosas y glándulas). Su función principal es la organización de la estructura tridimensional interna de la célula (por ejemplo, forman parte de la membrana nuclear y de la sarcómera), forman una barrera rígida que evita la entrada de microorganismos. Esa misma barrera cumple la vital función de retener agua dentro de las células. También participan en algunas uniones intercelulares (desmosomas). Se han identificado un total de 20 subunidades de queratinas en los diferentes tejidos epiteliales, que se clasifican en queratinas ácidas (tipo I) y básicas (tipo II) según su punto isoeléctrico; y de alto o bajo peso molecular. Las de elevado peso molecular se expresan en la mayoría de los epitelios estratificados y en los carcinomas escamosos; las de bajo peso molecular, por el contrario, son específicas de los epitelios simples y de los adenocarcinomas (67, 68).

Las CKs son, pues, proteínas esenciales para la estructura y función de los tejidos normales. Todas estas queratinas pertenecen a la familia de las proteínas de filamentos intermedios y, por tanto, comparten características proteico-estructurales comunes. Contienen un dominio central de ~ 310 amino ácidos con una conformación α -helicoidal, flanqueada por dominios no-helicoidales (cabeza y cola), de longitud variable. Una característica única de las queratinas es su apareamiento, la formación obligada de heterodímeros entre una queratina de tipo I y una queratina de tipo II (67).

Aparte de la principal función de los filamentos de queratina como importantes estabilizadores estructurales de las células epiteliales, esta función citoesquelética también trasciende al nivel de la propia célula como ente individual. Típicamente, los filamentos de queratina se insertan en los desmosomas y hemidesmosomas. Por tanto, contribuyen no solo a la estabilidad entre las células epiteliales, sino también a la unión a la membrana basal y más allá, al compartimiento del tejido conjuntivo de un determinado epitelio. Igualmente, se ha reconocido que las queratinas no son simplemente estructuras intracelulares esqueléticas estáticas, sino más bien altamente dinámicas, que intervienen en la función de protección de la barrera placentaria y trofoblástica, la protección de la apoptosis, la protección del hígado contra el estrés y daño, y la regulación de la síntesis proteica y tamaño celular durante la reparación de heridas que involucran vías de señalización intracelulares. Asimismo, también se piensa que estas proteínas podrían tener implicación en la polaridad epitelial y el tráfico de membrana (68).

Puesto que ciertos subtipos de queratinas se expresan solamente en algunos tejidos humanos normales pero no en otros, y viceversa, estos tejidos se han subclasificado de acuerdo al patrón de tinción con ellas. Los epitelios simples (no estratificados) generalmente expresan las queratinas epiteliales simples 7, 18, 19 y 20, mientras los epitelios complejos (estratificados) expresan queratinas epiteliales complejas 5/6, 10, 14 y 15. Cuando un epitelio sufre transformación maligna, su perfil de queratinas habitualmente permanece constante, salvo en algunas excepciones como ciertos carcinomas cutáneos no melanoma (69).

El uso del término basal en el epitelio mamario se refiere a una población celular que expresa ciertas citoqueratinas de alto peso molecular y que tuvo su origen en los trabajos de Moll y col. (68), quienes describieron mediante análisis por geles bidimensionales el catálogo de citoqueratinas humanas en células en cultivo, tejido epitelial normal y tumoral. En este trabajo también se identificaron dos grupos principales de cáncer de mama, basado en la

expresión de citoqueratinas de epitelios simples o estratificados. Moll y col. describieron una relación más exhaustiva de las citoqueratinas expresadas en los tumores y la relación con su epitelio normal. Este trabajo también confirmó que un pequeño grupo de cánceres de mama expresaban citoqueratinas de epitelios estratificados, incluyendo CK5, CK14 y CK17. Se reconoció que las citoqueratinas de alto peso molecular CK5 y CK14, que forman complejos *in vivo*, son expresadas por las células basales del epitelio estratificado, y por tanto, se reconocieron como queratinas basales. El término basal está relacionado con la expresión de queratinas basales (CK5/CK14) más que de una posición adyacente a la membrana basal.

Las CKs 8 y 18 se coexpresan típicamente y constituyen las queratinas primarias de los epitelios. Son las queratinas que aparecen más tempranamente en la embriogénesis. Se expresan difusamente en las células luminales y focalmente en las células basales/mioepiteliales. Por su parte las CKs 7 y 19 se expresan exclusivamente en las células luminales de los ductos y lobulillos mamarios (6, 68).

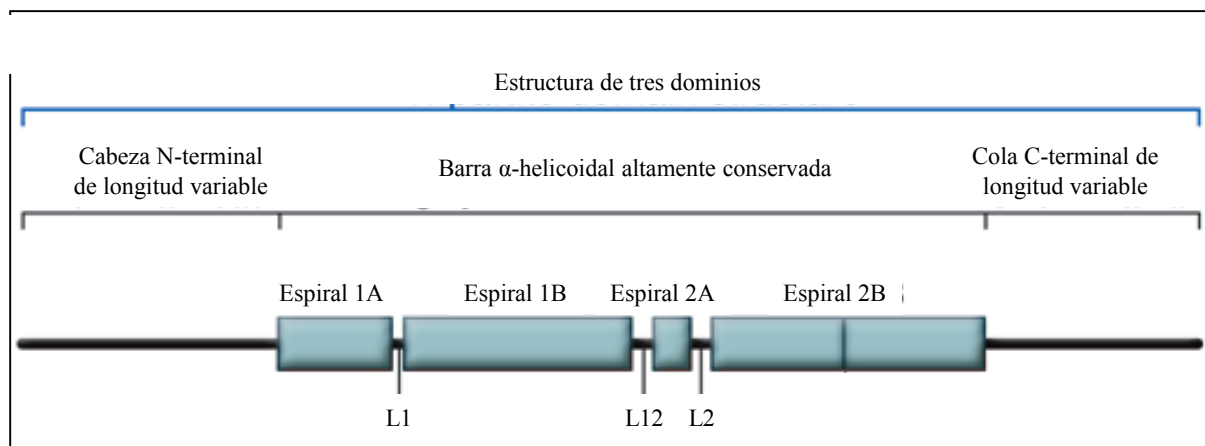


Figura 5. Representación esquemática de la estructura proteica de los filamentos intermedios. Todos ellos comparten una estructura de tres dominios consistente en un dominio central α -helicoidal altamente conservado, flanqueado por dominios de longitudes variables, uno de cabeza N-terminal y otro de cola C-terminal. (tomada de Eriksson) (70).

1.4.4.2. Vimentina

La vimentina es una proteína de 57 kDa y forma parte del citoesqueleto (Figura 6). La expresión de vimentina también se ha descrito en carcinomas de mama. Su expresión elevada se correlaciona bien con la migración e invasión de las células cancerosas y, por tanto, con peor pronóstico (71).

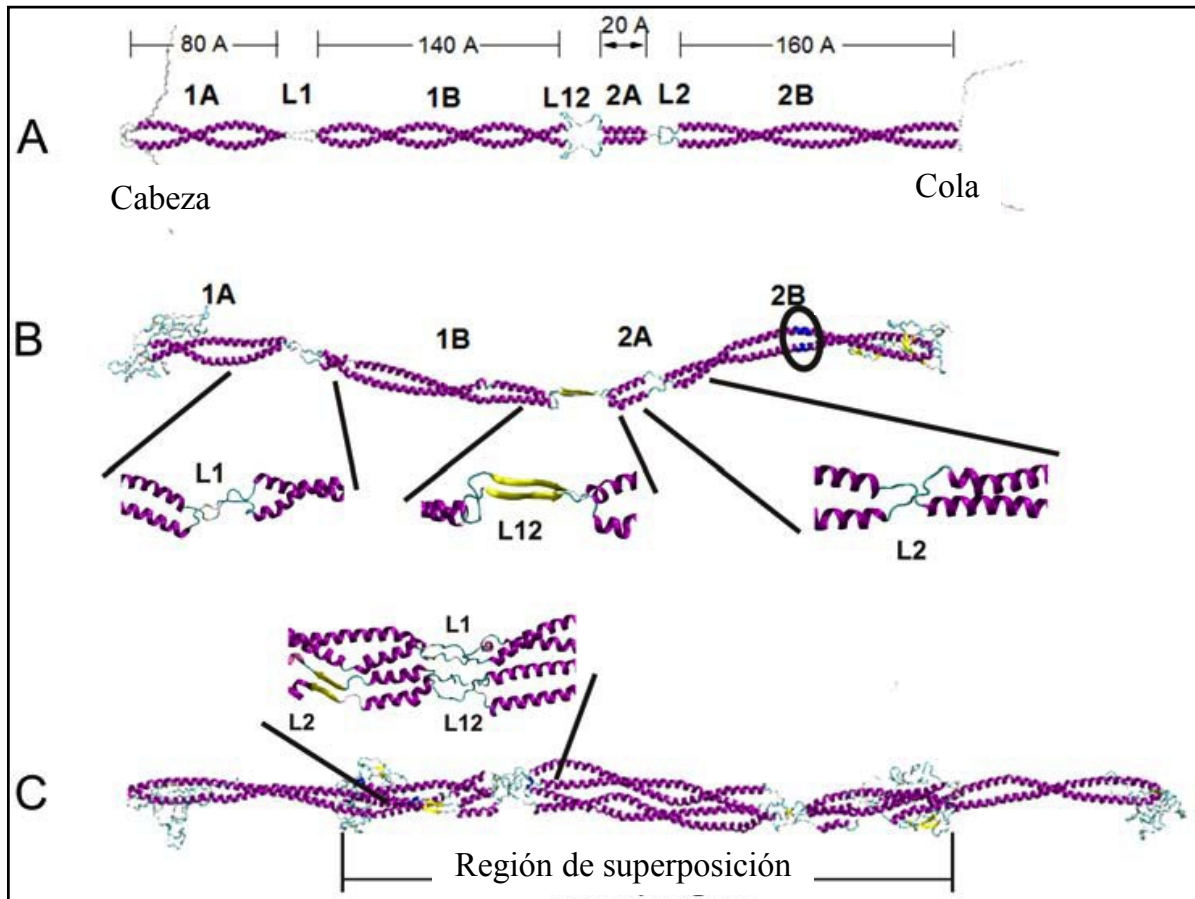


Figura 6. Representación esquemática de la estructura de la vimentina. A: Geometría esquemática del dímero, identificando los diferentes segmentos y dominios de enlace.

B: Vista del modelo del dímero. C: Vista del modelo del tetrámero
(tomada de Qin) (73).

La vimentina es el filamento intermedio más omnipresente y está en todos los tipos primitivos de células, pero en la diferenciación está co-expresada o reemplazada por otros filamentos intermedios. En el epitelio de la mama normal, la vimentina es expresada por las

células mioepiteliales, y en el cáncer de mama su expresión se asocia con alto grado histológico, falta de expresión de receptores de estrógeno, positividad del EGFR y de p53. Recientemente se ha mostrado asociación entre la expresión de vimentina y de marcadores usualmente expresados por las células mioepiteliales, tales como CK5/6, actina de músculo liso y CD10. Se ha reportado que la vimentina es expresada más frecuentemente en los tumores de tipo basal (7,72).

1.4.5. Marcadores de adhesión celular

1.4.5.1. Cadherina E

Una característica básica de las células cancerosas es que tienden a perder la adherencia entre ellas. La adhesión célula-célula es mediada por una variedad de proteínas de membrana, tales como las cadherinas (E, N, P, R, VE), claudinas, ocludinas, nectinas y las cadherinas desmosomales. Las cadherinas son necesarias para iniciar los contactos célula-célula; otros complejos de proteínas de adhesión subsecuentemente se ensamblan para mantener el continuo estructural del epitelio. La cadherina E es una glucoproteína transmembrana sintetizada por el gen *CDH1* localizado en el cromosoma 16q22.1. La cadherina E se expresa fundamentalmente en las células epiteliales. Su región extracelular tiene una función de adhesión homofílica dependiente de Ca^{2+} y el dominio citoplasmático interactúa con cateninas (74,75).

La cadherina E ha generado un interés especial debido a que sus funciones están frecuentemente alteradas en las células cancerosas metastásicas. La cadherina E está ligada al citoesqueleto a través de su asociación con varias cateninas citoplasmáticas. La parte yuxtamembranosa intracelular de la cadherina E se une a la catenina p120, una proteína capaz de modular el agrupamiento de la cadherina E (Figura 7). La disminución de la expresión de cadherina E durante la progresión del cáncer se correlaciona con agresividad del tumor y peor pronóstico. La pérdida de cadherina E durante la progresión tumoral lleva a la acumulación

de beta-catenina en el citoplasma, lo que determina la estimulación de la vía Wnt. Basado en estos resultados, se ha hipotetizado que la cadherina E actúa como un supresor de invasión y metástasis y que la perturbación de su función ocurre tarde en la progresión tumoral. La cadherina E también tiene una función esencial en procesos fisiológicos normales, tales como el desarrollo, polaridad celular y morfología tisular, así como en estados patológicos como la transición epitelial-mesenquimal (TEM), un proceso mediante el cual las células tumorales pierden sus marcadores epiteliales y migran a órganos distantes. La pérdida de la expresión de cadherina E está relacionada con un mayor tamaño tumoral, mayor grado tumoral y mayor frecuencia de metástasis en cáncer de mama (74, 75).

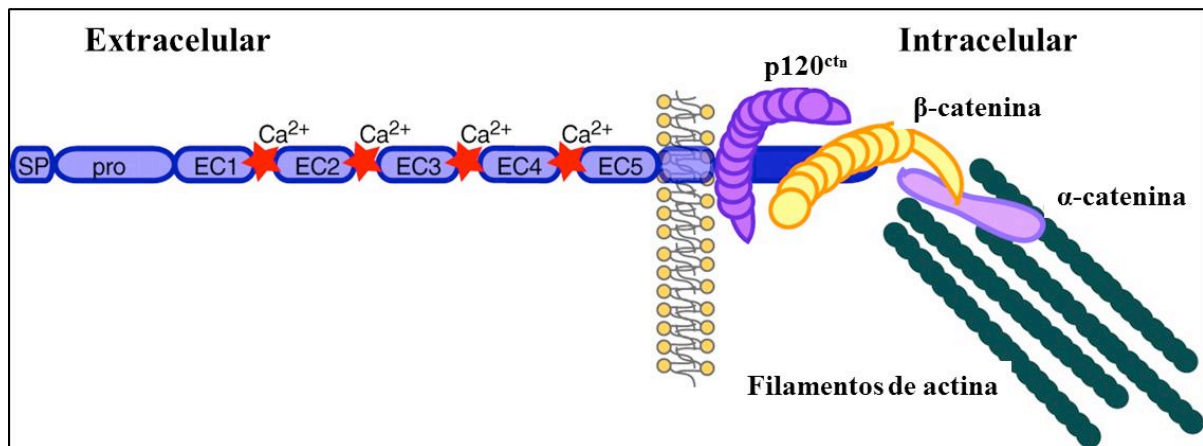


Figura 7. Representación esquemática de la estructura de la cadherina E. Estructura del dominio cadherina. Las cadherinas son proteínas transmembrana que son sintetizadas con un péptido simple (SP) y una pro-región, que son eliminados durante el procesamiento proteico. El dominio extracelular comprende cinco repeticiones homólogas (EC1-EC5) con sitios de unión a iones de calcio (Ca^{2+}). El dominio citoplasmático se une a p120-catenina (p120^{ctn}) cerca de la membrana plasmática y a la β -catenina cerca del extremo C-terminal. La α -catenina se une a la β -catenina para ligarse el complejo cadherina al citoesqueleto de actina (modificada de Wheelock) (78).

El gen de la cadherina E se encuentra somáticamente inactivado en el carcinoma lobulillar de la mama, siendo éste un tipo histológico con fenotipo altamente invasivo y metastásico, con mal pronóstico. De hecho, la falta de expresión de cadherina E se utiliza en la práctica de

rutina para diferenciar los carcinomas lobulillares de los ductales. Constituye un excelente ejemplo de correlación entre genotipo y fenotipo (76,77).

1.4.5.2. Cadherina P

El gen que codifica para cadherina P es el gen *CDH3*; comparte 66% de homología con el gen *CDH1* (cadherina E), y se localiza también en el cromosoma 16q22.1. La glucoproteína cadherina P madura tiene un peso molecular de 118 kDa, y su estructura es similar a la de las cadherinas clásicas, pero difiere en cuanto a su especificidad inmunológica y masa molecular. Está compuesta por tres dominios distintivos (extracelular, transmembrana y citoplasmático) y principalmente, pero no exclusivamente, promueve interacciones homotípicas entre cadherinas del mismo tipo. El dominio amino terminal es esencial para la creación de dímeros laterales que actúan juntos en una estructura parecida a un cierre entre células vecinas. La función y la fuerza de la adhesión mediada por cadherina P probablemente dependen de su asociación dinámica con las cateninas citoplasmáticas. Estas moléculas sirven para ligar la cola citoplasmática de la cadherina al citoesqueleto de actina y facilita el agrupamiento en la estructura de unión, formando los complejos cadherina-cateninas. La cadherina P alterada se ha detectado en varios tumores humanos, aunque su rol no está claro en el proceso carcinogénico, pues depende del modelo estudiado (79). En cáncer de mama la expresión de cadherina P se ha asociado a un aumento de la invasión celular y agresividad tumoral y constituye un factor que indica peor pronóstico. Además, estudios de micromatrices han demostrado expresión aberrante de cadherina P en un pequeño grupo de carcinomas, esencialmente de fenotipo TN (79-81).

1.4.5.3. Proteína p120

El complejo cadherina E contiene muchas moléculas citoplasmáticas de señalización, incluyendo alfa, beta y gamma cateninas, p120ctn y Shc. Entre ellas, p120ctn se ha identificado como un potencial regulador de la motilidad celular. La regulación dinámica del

citoesqueleto de actina es esencial para la morfología y movimiento celular, y la familia Rho de pequeñas GTPasas juega un importante papel en estos procesos. La sobreexpresión de p120 altera drásticamente la morfología celular al regular a miembros de la familia Rho. La sobreexpresión de cadherina P se asocia fuertemente con la acumulación citoplasmática de p120, activando las Rho GTPasas y promoviendo la motilidad celular (76,82).

La catenina p120 fue descrita por primera vez en 1989 como un sustrato de Src cuya fosforilación se correlacionaba con transformación oncogénica. p120 parece tener múltiples roles en la diferenciación celular. Se encuentra relacionada con una amplia gama de oncogenes y genes supresores, incluyendo las quinasas Src, receptores tirosina quinasas, receptores tirosina fosfatasas, cadherina E, β -catenina, APC, Rho GTPasas, Kaiso y los efectores de la ruta de señalización Wnt. Estas observaciones sugieren un papel relevante en algunas actividades celulares asociadas con cáncer, tales como la adhesión celular, motilidad, morfología y crecimiento (83).

1.4.6. Marcadores del citoesqueleto celular

1.4.6.1. Actina

La proteína actina está altamente conservada en las células eucariotas y juega un papel importante en un amplio rango de funciones celulares. La actina se encuentra básicamente en dos formas: la actina monomérica (globular o G-actina) y su contraparte polimerizada, la actina filamentosa (F-actina). El equilibrio dinámico entre las formas está controlado por una variedad de factores dentro de la célula. Los filamentos de actina constituyen la estructura central de todos los tejidos musculares, y su polimerización controlada, en forma de redes entrelazadas de filamentos de actina, producen la fuerza para la motilidad celular (84,85).

La actina juega un papel importante en diversos procesos tales como el establecimiento de la polaridad celular, induciendo cambios de forma de la célula, la motilidad celular, adhesión, citoquinesis, endocitosis y el tráfico intracelular. La actina también es un importante

componente estructural y funcional del núcleo, involucrado en la transcripción y remodelaje cromatínico (85). El genoma humano contiene cuatro genes de actinas musculares (esquelética: *ACTA1*; lisa: *ACTA2*; entérica: *ACTG2*; cardíaca: *ACTC*) y dos genes de actinas citoplasmáticas (*ACTB* y *ACTG1*), que codifican para seis isoformas. Todas ellas se encuentran en diferentes cantidades en distintos tipos de células. Las isoformas difieren entre sí solamente en algunos aminoácidos, sin embargo, algunas propiedades difieren cualitativamente (84,85). Las actinas de músculo liso son marcadores de células mioepiteliales (86).

1.4.6.2. Calponina

La calponina (CaP) es una proteína que actúa como ligando de la actina y regula la actividad de la miosina ATPasa. Hay tres isoformas reconocidas hasta la fecha, llamadas h1 (bCaP), h2 (neutral CaP) y CaP ácida, codificadas por tres diferentes genes. La isoforma más abundante es la bCaP. Es capaz de unirse a la actina, calmodulina, troponina C y tropomiosina. Se expresa en músculo liso y tejidos que contienen cantidades significativas de músculo liso. También se ha demostrado en células mioepiteliales de lesiones mamarias benignas y malignas. La baja expresión de CaP es un marcador de mal pronóstico en muchos cánceres, llevando a la hipótesis que niveles de CaP mal regulados están relacionados con el cáncer. Se ha especulado que la baja expresión de CaP en las células musculares lisas de los tumores de vasos sanguíneos lleva a una desestabilización de los filamentos de actina, debilitando la adhesión de las células entre sí y con la matriz extracelular. Esto puede ser una causa que contribuya con la falta de cohesión y penetrabilidad de las células tumorales metastásicas (87).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Existen subcategorías en las clases moleculares del cáncer de mama que pueden ser identificadas mediante inmunohistoquímica con el uso de un panel de anticuerpos para así predecir mejor su pronóstico. Una mejor caracterización inmunofenotípica de los carcinomas de mama permitirá avanzar en el establecimiento de diferentes categorías con distinto pronóstico.

2.2. Objetivos

El objetivo general que nos hemos planteado en este trabajo es el de profundizar en el conocimiento de la biología molecular y la caracterización inmunofenotípica del cáncer de mama. Para ello, nos hemos planteado los siguientes objetivos específicos:

- 1) Determinar el perfil de inmunoexpresión de diferentes marcadores en los tipos moleculares conocidos de carcinoma de mama.
- 2) Relacionar los diferentes tipos moleculares de carcinoma de mama con su evolución clínica y algunas variables clínico-patológicas.
- 3) Relacionar la expresión de los marcadores inmunohistoquímicos con la evolución clínica de cada tipo molecular de carcinoma de mama.
- 4) Establecer los marcadores de valor pronóstico para cada clase molecular de carcinoma de mama.
- 5) Definir diferentes subclases moleculares del carcinoma de mama en función del valor pronóstico de los marcadores inmunohistoquímicos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en pacientes diagnosticadas de carcinoma ductal infiltrante de mama en seguimiento en el Instituto de Oncología “Dr. Miguel Pérez Carreño” (IOMPC) de Valencia (Venezuela). Se analizó la expresión de 22 moléculas y se compararon los resultados obtenidos con las clases moleculares definidas por inmunohistoquímica, de acuerdo a la expresión de RE, RP y HER2, con las distintas variables clínico-patológicas recogidas (la edad, el estadio clínico, el grado histológico y la supervivencia).

3.1. Sujetos del estudio

Entre los años 2000 al 2008 se trataron en el Instituto de Oncología “Dr. Miguel Pérez Carreño” (IOMPC) de Valencia (Venezuela) 1789 pacientes con cáncer de mama. De éstas, fueron seleccionadas para este estudio las pacientes que cumplieron los siguientes criterios de inclusión:

- Diagnóstico de carcinoma ductal infiltrante de mama sin otra especificación, o mixto, con componente ductal predominante.
- Disponibilidad de las preparaciones histológicas y bloques de parafina respectivos correspondientes al diagnóstico inicial en el archivo del Servicio de Anatomía Patológica del Instituto.

Con estos criterios, se seleccionaron inicialmente 368 pacientes. Tras realizar las matrices de tejidos, se desearon 14 casos, quedando la serie constituida definitivamente por un total de 354 casos.

Este estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética y de la Comisión de Investigación del Instituto de Oncología “Dr. Miguel Pérez Carreño”.

Las muestras tisulares se fijaron en formol al 10% y se incluyeron en parafina siguiendo los métodos convencionales. De los bloques de parafina se obtuvieron secciones histológicas de 4 μ m de espesor que posteriormente se tiñeron con hematoxilina-eosina. Se revisaron las preparaciones histológicas y se seleccionaron cuidadosamente las zonas con tumor, marcando esas mismas áreas en el bloque de parafina.

3.2. Definición de variables clínico-patológicas

Se estudiaron las siguientes variables clínico-patológicas:

- Edad: al momento del diagnóstico, como variable cuantitativa. Además se analizaron diferentes grupos etarios (≤ 40 ; 41-50; 51-65; ≥ 66) y se estableció un punto de corte en pacientes mayores y menores de 50 años.
- Estadio clínico: se tomó el que figura en la historia clínica de cada paciente, establecido por el Servicio de Patología Mamaria del IOMPC. Se consideraron los cuatro estadios mayores: I, II, III y IV.
- Grado histológico: se establecieron las tres categorías clásicas de Bloom-Richardson con las modificaciones de Elston y Ellis (Elston 1991), correspondiendo el GH I a los tumores bien diferenciados y el GH III a los pobremente diferenciados.
- Supervivencia global (meses): se tomó como punto de corte un seguimiento de 60 meses (5 años), con un mínimo de 36 meses. Se evaluó únicamente la supervivencia global. Se estableció el tiempo de supervivencia como el tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta la fecha de la muerte en caso de haber ocurrido antes de los 60 meses.

3.3. Método inmunohistoquímico de la expresión proteica

3.3.1. Construcción de la matriz de tejidos

Las matrices de tejidos (*tissue arrays*, TMA) así como las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* fluorescente, fueron realizadas en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario La Paz de Madrid (España). Para realizar los TMA se prepararon los bloques receptores o bloques únicamente de parafina, de un tamaño aproximado de 5x4 cms. La serie completa de bloques donantes se dividió en grupos de 41 bloques. En cada tumor se seleccionaron dos zonas diferentes en el bloque de tejido (donante). Se estableció el orden de estos bloques en una plantilla que sirvió después para su lectura en el microscopio.

El bloque receptor se colocó en la base del equipo *tissue arrayer* (estación de trabajo Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA) ajustándose bien a ésta para evitar su movimiento. El *tissue arrayer* consta de dos agujas de distintos calibre con las que se realiza el troqueado de los bloques. Con la aguja de mayor calibre se extrae un cilindro de parafina del bloque receptor dejando el espacio donde se introducen los cilindros obtenidos de los bloques donantes. Con la aguja de menor calibre se obtiene el cilindro con el material de la zona marcada del bloque donante que se introduce en el bloque receptor. Para asegurar la zona elegida a estudio se realiza un duplicado de la plantilla en el mismo bloque, obteniéndose así dos cilindros de 1mm de diámetro de cada caso (Figura 7).

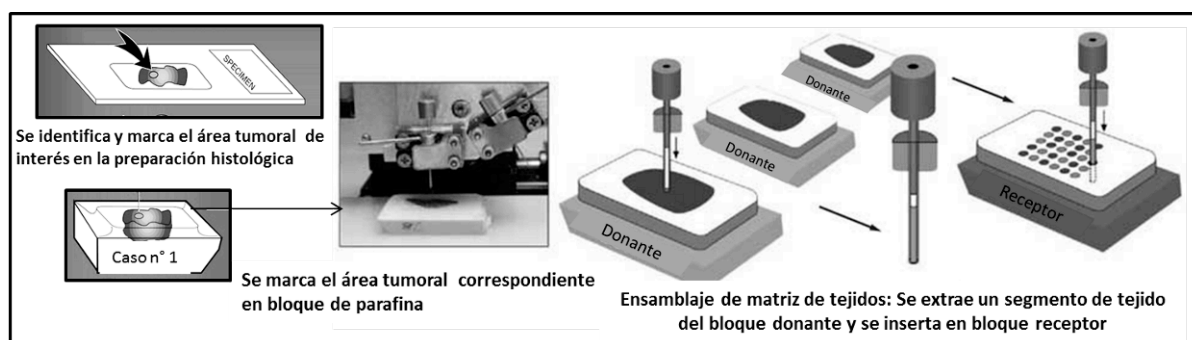


Figura 7. Representación esquemática de la construcción de matrices de tejidos.

Una vez terminado el proceso de troquelado de todos los bloques, se introdujo el nuevo bloque en la estufa a una temperatura de 45° durante 5 min. para que la parafina de los cilindros y del bloque receptor se amolden y la superficie se alise.

3.3.2. Inmunohistoquímica

Los cortes de los bloques se realizaron de 4µm en un micrótopo de rotación (Microm HM350S) en cristales tratados para evitar el desprendimiento de los cortes y se introdujeron durante 30 min. a 65° en estufa para secarlos. Inicialmente se construyeron nueve bloques (ocho con 41 casos y uno con 40 casos) y luego se construyó uno adicional con casos sin celularidad neoplásica representativa en las dos muestras obtenidas previamente de cada caso. Catorce casos tuvieron que ser desechados por no presentar suficiente tejido tumoral, por lo que finalmente se analizaron 354 tumores de los 368 casos inicialmente incluidos en el estudio.

La desparafinización y la recuperación antigénica se realizaron en el equipo PTL Link DAKO, con un buffer Tris-EDTA pH=9 (DAKO) a 95° durante 20 min.

Una vez terminada la recuperación antigénica las muestras se colocaron en un equipo de inmunotinción automática en horizontal (Autostainer Plus, DAKO). Las muestras se lavaron en agua destilada y a continuación en tampón Tris pH=7,4 a temperatura ambiente. Se realizó la incubación con el anticuerpo primario (Tabla 3). Las muestras se lavaron en tampón Tris pH=7,4 y se añadió el anticuerpo secundario (Envision, Dako). Por último, las muestras se lavaron en tampón Tris pH=7,4 y se revelaron mediante la aplicación del cromógeno diaminobencidina, durante 5 minutos. Con el fin de visualizar los núcleos, se realizó la tinción nuclear con hematoxilina.

Cada cilindro de los TMA fue analizado en dos ocasiones y los datos recogidos se anotaron en tablas diseñadas para tal fin. Se consideró como valor definitivo el promedio de las

observaciones. Los casos dudosos o con medidas muy diferentes se consultaron con otro patólogo experto en inmunohistoquímica (Dr. David Hardisson y/o Dr. Eduardo Caleiras).

Los anticuerpos utilizados, la dilución, clon y fuente se muestran en la Tabla 3.

Marcador	Dilución	Clon	Casa comercial	Localización del marcaje
RE	1/50	GF 11	Novocastra	Nuclear
RP	1/100	clon 636	Dako	Nuclear
HER-2/neu	Prediluido	Kit Herceptest	Dako	Membrana
EGFR	Prediluido	Kit PharmDx	Dako	Membrana
C-Kit	1/50	Policlonal	Dako	Citoplasma
p63	1/50	4A4	Dako	Nuclear
Survivina	1/400	Policlonal	ABCAM	Nuclear y citoplasma
ALDH1	1/100	EP1933Y	ABCAM	Nuclear y/o citoplasma
CD10	1/50	OPD4	Novocastra	Citoplasma
Ki-67	1/100	clon MIB-1	Dako	Nuclear
CK 5/6	Prediluido	D5116B4	Dako	Citoplasma
CK 8/18	1/100	5D3	Novocastra	Citoplasma
CK14	1/20	002	Novocastra	Citoplasma
CK17	1/20	E3	Novocastra	Citoplasma
CK APM	1/50	34BE12	Dako	Citoplasma
Vimentina	1/200	Clon V9	Dako	Citoplasma
Cadherina E	Prediluido	NCI	Dako	Membrana
Cadherina P	1/100	56	BD	Membrana
p120	1/200	98	BD	Membrana
Actina ml	1/100	HHF35	Dako	Citoplasma
Alfa-actina	1/100	1A4	Dako	Citoplasma
Calponina	1/100	CALP	Dako	Citoplasma

APM = alto peso molecular. MI = músculo liso

Tabla 3. Anticuerpos: dilución, clon y fuente de anticuerpos utilizados.

3.3.3. Método de hibridización *in situ* fluorescente (FISH)

Para esta prueba se utilizó el kit de PathVysion *HER-2*. Las secciones histológicas se colocaron en una estufa a 56°C toda la noche. Las secciones sin teñir se desparafinaron en CitriSolv (Vysis), se deshidrataron en etanol al 100% y se secaron al aire. Se procedió entonces a una digestión con proteasa durante 60 minutos, desnaturalización, e hibridización con sondas precalentadas para el gen *HER-2* y el centrómero del cromosoma 17 (sonda Her2/*neu*/CEP17 SG, Vysis) durante toda la noche a 37°C. A continuación se lavaron con buffer de lavado poshibridización a 72°C y se contratiñeron con 4.6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en solución antifade. Por último, se montaron y analizaron en un microscopio de fluorescencia. La tasa de amplificación de *HER-2* se determinó mediante el cociente: número de copias de *HER-2* (señales rojas)/ número de copias de centrómeros (señales verdes). Una tasa $>2,2$ indica amplificación del gen *HER-2*, si la tasa es $\leq 2,2$ se considera que no hay amplificación (Figura 8).

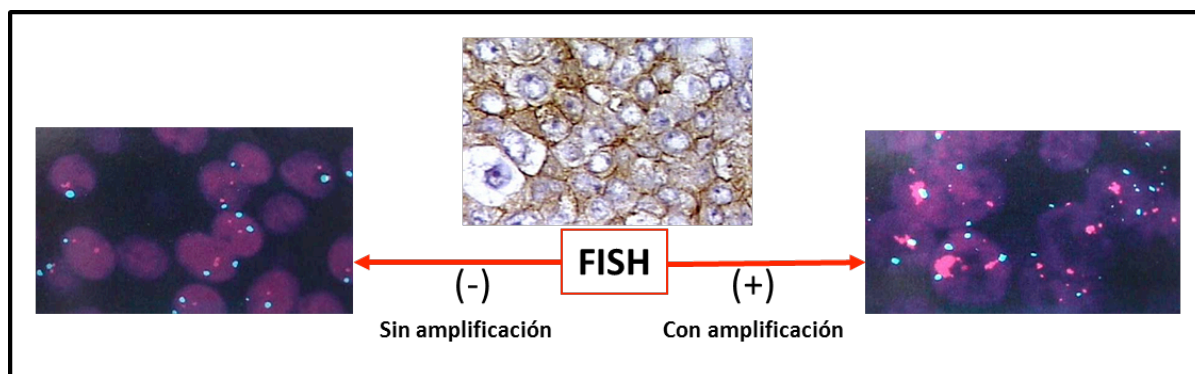


Figura 8. Interpretación de resultados de la hibridización in situ fluorescente (FISH).

3.3.4. Interpretación de los resultados del estudio inmunohistoquímico

Para la mayoría de los marcadores se consideró positivo cualquier tipo de inmunoexpresión, refiriendo el resultado como positivo o negativo a efectos del análisis estadístico. En la valoración de las moléculas de adhesión se consideró positiva a la tinción de membrana

conservada en más del 50% de las células neoplásicas y negativa cuando la tinción se encontraba ausente o reducida.

La expresión de HER2 se evaluó de acuerdo al patrón establecido en el Kit comercial Herceptest®, por lo que se consideraron positivos los casos con inmunotinción valorada como 3+. En los casos con tinción equívoca (valorados con 2+) se corroboró la amplificación de HER2 mediante hibridización *in situ* fluorescente (FISH) (ver apartado anterior). Para la evaluación del EGFR se utilizaron los parámetros del kit PharmDx® utilizado.

Para la cuantificación de Ki-67 (índice de proliferación) se tomaron cuatro microfotografías de cada caso, dos de cada cilindro, en un microscopio Zeiss Axiostar plus, con cámara Canon incorporada y conectada a ordenador con el programa Axiovision. Luego se contaron los núcleos positivos y negativos en cada imagen utilizando el programa Bronce, elaborado por el ingeniero Víctor Barrios de la Universidad de Carabobo. Finalmente se sumaron las cifras de los cuatro contajes y se obtuvo el índice de proliferación como promedio del porcentaje de positividad para cada caso.

El índice de proliferación (Ki-67) se interpretó de la siguiente manera:

- Bajo: porcentaje de núcleos positivos de las células tumorales <14%.
- Intermedio: porcentaje de núcleos positivos de las células tumorales $\geq 15\%$ y $\leq 24\%$.
- Alto: porcentaje de núcleos positivos de las células tumorales >25%.

En base a los resultados obtenidos del análisis de RE, RP y HER2, y de acuerdo a los criterios aceptados (Nielsen 2004, Livasy 2006, Carey 2007) se clasificaron los casos como sigue:

- Luminal A: RE+ RP+;
- Luminal B: Positivo a RE o RP, independientemente del marcaje de HER2;
- HER2+: RE- RP- HER2+;
- Triple negativo: RE- RP- HER2-.

Para el análisis de los casos, desde un punto de vista práctico, se agruparon los 22 marcadores utilizados en cuatro grupos:

- Marcadores de la clasificación molecular (ER, PR y HER2).
- Marcadores de proliferación celular y otros (EGFR, C-Kit, p63, survivina, ALDH1, CD10 y Ki-67).
- Marcadores de filamentos intermedios (CK5/6, CK8/18, CK14, CK17, CKAPM y vimentina).
- Marcadores de adhesión celular y citoesqueleto (cadherina E, cadherina P, p120, actina de músculo liso, alfa actina y calponina).

Cuando se establecieron los subgrupos de las clases moleculares, se tomó en consideración por un lado si los marcadores estaban relacionados o no con las células basales o mioepiteliales, así como si en la literatura describen su expresión fundamentalmente en el tipo basal (37-42,81). En este sentido, se consideraron como marcadores basales: EGFR, C-Kit, p63, CD10, CK 5/6, CK14, CK17, vimentina, cadherina P, actina muscular, alfa-actina y calponina.

Se consideraron los siguientes subtipos para cada clase molecular:

Luminal A

- Según grupos de Ki-67
- Según la expresión de marcadores de tipo basal

Luminal B

- Según grupos de Ki-67
- Según expresión de HER2
- Según expresión de marcadores basales

HER2

- Según grupos de Ki-67

- Según expresión de marcadores basales

Triple negativo

- Según grupos de Ki-67
- Según expresión de marcadores basales

3.4. Análisis estadístico

El análisis de los datos recogidos se realizó mediante el paquete estadístico SPSS versión 19 (IBM Statistical Package for Social Sciences, Inc., Chicago, IL). En el estudio descriptivo se expresaron los resultados como media y desviación estándar en el caso de variables cuantitativas, y como número absoluto y porcentaje en las cualitativas.

La asociación entre las variables clínico-patológicas, clases moleculares y marcadores inmunohistoquímicos se analizó con la prueba de Chi cuadrado y el test exacto de Fisher. Cuando las variables no se ajustaban a la normalidad, se usó la U de Mann-Whitney.

El estudio de supervivencia se realizó mediante el método de Kaplan-Meier y el ajuste de modelos de regresión de Cox. Las curvas de supervivencia se compararon con los test de log-rank y Breslow. Se consideraron significativos valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Análisis descriptivo

4.1.1. Variables clínico-patológicas

La edad media de las pacientes en el momento del diagnóstico fue de 51,28 años, con un rango de 27-85 años. Un 52% tenían 50 años de edad o menos y un 48% eran mayores de 50 años.

El estadio clínico más frecuente fue el III (58,8%), seguido por el II (33,7%), abarcando entre ambos el 92,5% de los casos.

Histológicamente, un 15,5% fueron grado I, un 49,7% grado II y un 34,7% grado III.

Se logró obtener el seguimiento de 321 pacientes. El tiempo de seguimiento para las pacientes no fallecidas varió de 36 a 112 meses. La supervivencia global media fue de 46,11 meses, con rango de 2 a 60 meses y desviación típica de $\pm 16,21$ meses.

Un 57,3% de los pacientes fallecieron por la neoplasia a lo largo del seguimiento, mientras que un 42,7% permanecieron vivas durante el lapso del mismo.

Los principales datos clínico-patológicos de las pacientes incluidas en este estudio se detallan en la Tabla 4.

4.1.2. Clases moleculares

En esta serie de 354 tumores, el porcentaje de expresión positiva para RE fue de 57,9% (205 de 354), 49,4% (175 de 354) para RP y 14,7% (52 de 354) para HER2. En base a estos resultados se establecieron las clases moleculares clásicas de acuerdo a los siguientes porcentajes: Luminal A 42,4% (150 de 354), Luminal B 20,3% (72 de 354), HER2 9% (32 de 354) y TN 28,2% (100 de 354).

Variable	n (%)	
Edad (años): media (rango)	51,28 (27-85)	
	≤ 40	55 (15,5)
	41-50	129 (36,4)
	51-65	134 (37,9)
	≥ 66	36 (10,2)
	Total	354 (100)
	≤ 50	184 (52)
	≥ 51	170 (48)
	Total	354 (100)
Estadio clínico	I	9 (2,6)
	II	117 (33,7)
	III	204 (58,8)
	IV	17 (4,9)
	Total	347 (100)
Grado histológico	I	55 (15,5)
	II	176 (49,7)
	III	123 (34,7)
	Total	354 (100)
Supervivencia global (meses)	46,11	
Estado (n=321)	Fallecida	184 (57,3)
	Viva	137 (42,7)

Tabla 4. Características clínico-patológicas de la serie (número total de casos de 354).

4.1.3. Análisis de la expresión de diferentes marcadores por inmunohistoquímica

La expresión de los restantes marcadores, con sus respectivos porcentajes, casos válidos y no valorables para cada uno, se muestra en la Tabla 5.

Marcador		n (%)	n (%)
		Válidos	No valorables
EGFR	Negativo	326 (96,4)	
	Positivo	12 (3,6)	
	Total	338 (95,5)	16 (4,5)
C-Kit	Negativo	253 (88,8)	
	Positivo	32 (11,2)	
	Total	285 (80,5)	69 (19,5)
p63	Negativo	267 (84,0)	
	Positivo	51 (16,0)	
	Total	318 (89,8)	36 (10,2)
Ki-67	Bajo	92 (26,6)	
	Intermedio	93 (26,9)	
	Alto	161 (46,5)	
	Total	346 (97,7)	8 (2,3)
Survivina	Negativo	52 (16,7)	
	Positivo	259 (83,3)	
	Total	311 (87,9)	43 (12,1)
ALDH-1	Negativo	220 (73,6)	
	Positivo	79 (26,4)	
	Total	299 (84,5)	55 (15,5)
CD10	Negativo	152 (90,5)	
	Positivo	16 (9,5)	
	Total	168 (47,5)	186 (52,5)
CK5/6	Negativo	300 (92,0)	
	Positivo	26 (8,0)	
	Total	326 (92,1)	28 (7,9)
CK8/18	Negativo	8 (2,7)	
	Positivo	291 (97,3)	
	Total	299 (84,5)	55 (15,5)
CK14	Negativo	257 (93,1)	
	Positivo	19 (6,9)	
	Total	276 (78,0)	78 (22,0)

CK17	Negativo	248 (90,2)	
	Positivo	27 (9,8)	
	Total	275 (77,7)	79 (22,3)
CK APM	Negativo	59 (34,5)	
	Positivo	112 (65,5)	
	Total	171 (48,3)	183 (51,7)
Vimentina	Negativo	217 (73,1)	
	Positivo	80 (26,9)	
	Total	297 (83,9)	57 (16,1)
Cad E	Negativo	82 (26,7)	
	Positivo	225 (73,3)	
	Total	307 (86,7)	47 (13,3)
Cad P	Negativo	194 (59,5)	
	Positivo	132 (40,5)	
	Total	326 (92,1)	28 (7,9)
p120	Negativo	11 (7,7)	
	Positivo	132 (92,3)	
	Total	143 (40,4)	211 (59,6)
Actina ML	Negativo	137 (95,1)	
	Positivo	7 (4,9)	
	Total	144 (40,7)	210 (59,3)
Alfa-actina	Negativo	102 (93,6)	
	Positivo	7 (6,4)	
	Total	109 (30,8)	245 (69,2)
Calponina	Negativo	236 (89,1)	
	Positivo	29 (10,9)	
	Total	265 (74,9)	89 (25,1)

Cad = cadherina. APM = alto peso molecular. ML = músculo liso

Tabla 5. Expresión de diferentes marcadores por inmunohistoquímica.

El porcentaje de positividad de expresión de los diferentes marcadores varió del 3,6 al 97,7%.

Los casos no valorables por desgaste del bloque de parafina oscilaron entre un 2,3% para el Ki-67 y 69,2% para la alfa-actina.

Las Figuras 9 a 14 muestran ejemplos representativos de los patrones de expresión inmunohistoquímica observados en cada uno de los marcadores analizados en este estudio.

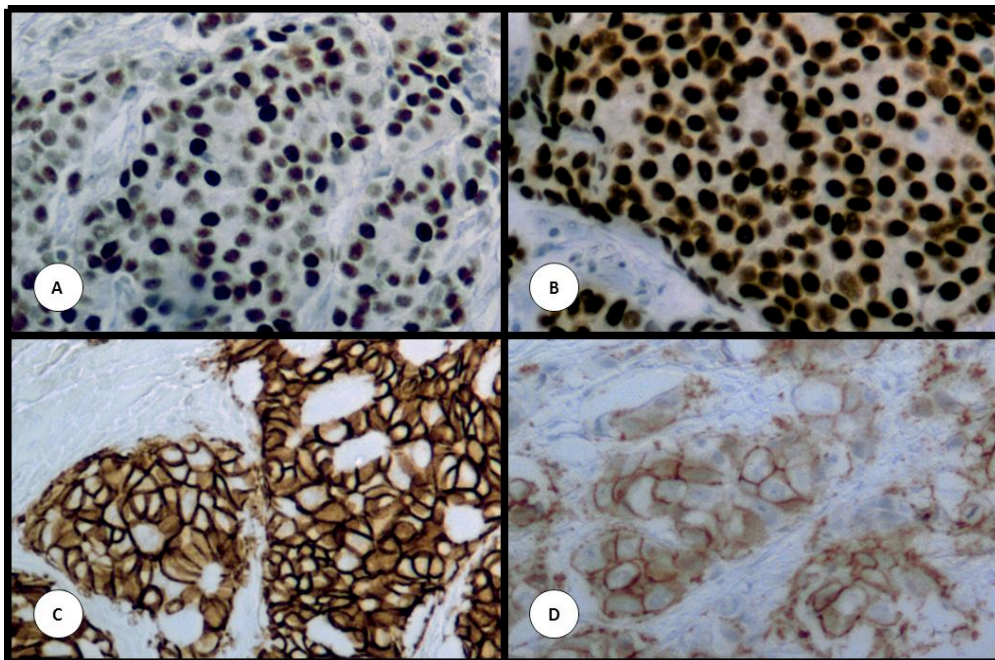


Figura 9. Expresión de proteínas estudiadas por inmunohistoquímica en matrices de tejidos.

(A) Receptores de estrógeno. (B) Receptores de progesterona. (C) HER2 +++. (D) HER2 ++.

Aumento original de 200x.

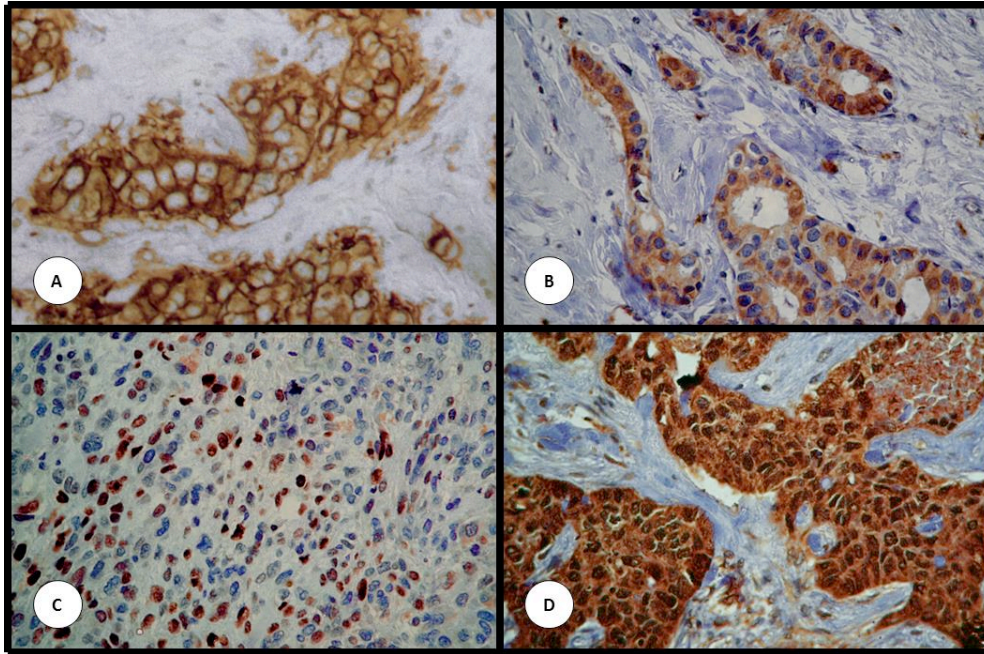


Figura 10. Expresión de proteínas estudiadas por inmunohistoquímica en matrices de tejidos.
(A) Receptor del factor de crecimiento epidérmico 1 (EGFR). (B) C-Kit. (C) p63. (D) Survivina. Aumento original de 200x.

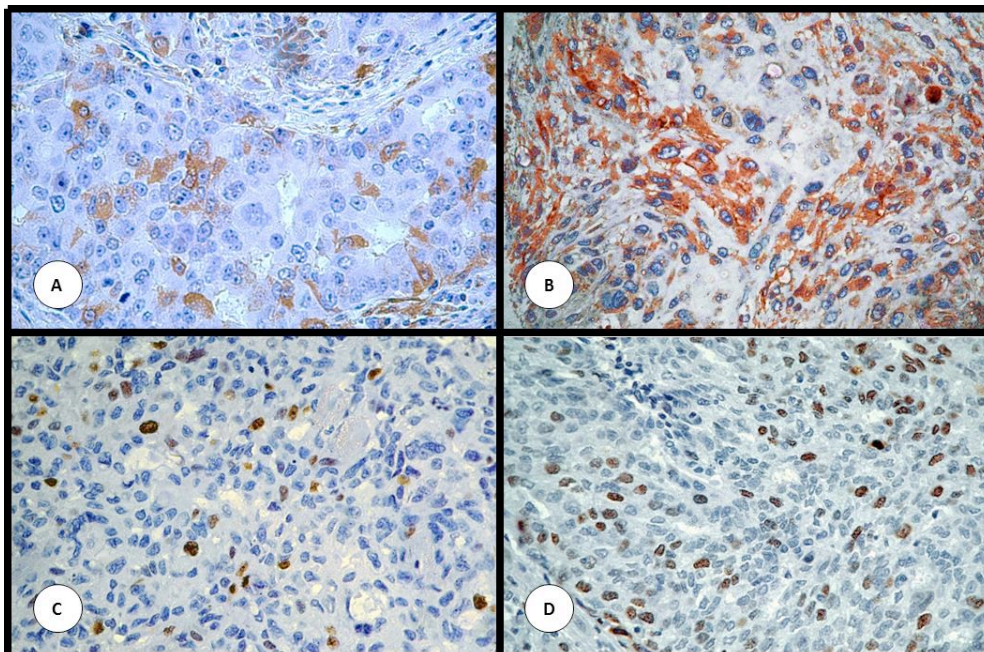


Figura 11. Expresión de proteínas estudiadas por inmunohistoquímica en matrices de tejidos.
(A) Aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1). (B) CD10. (C) Ki-67 bajo. (D) Ki-67 alto.
Aumento original de 200x.

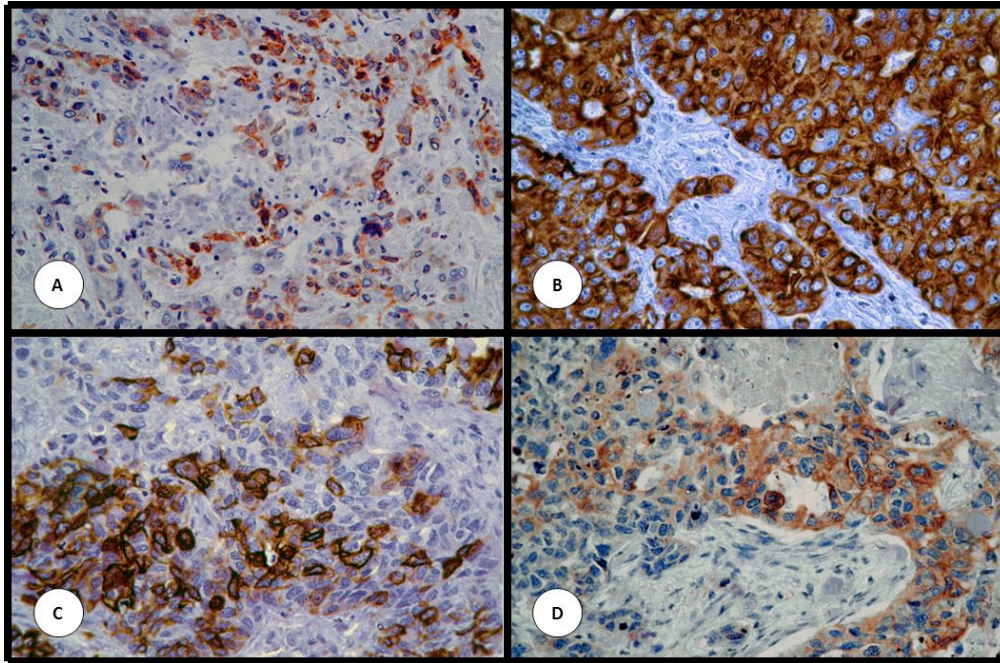


Figura 12. Expresión de proteínas estudiadas por inmunohistoquímica en matrices de tejidos. (A) CK5/6. (B) CK8/18. (C) CK14. (D) CK17. Aumento original de 200x.

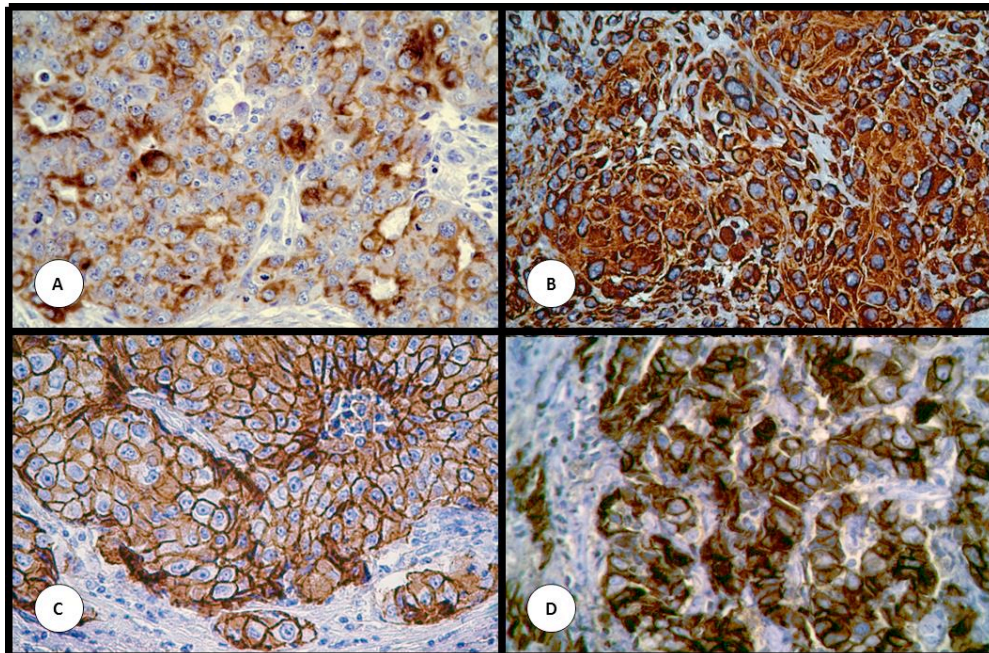


Figura 13. Expresión de proteínas estudiadas por inmunohistoquímica en matrices de tejidos. (A) CK APM. (B) Vimentina. (C) Cadherina E. (D) Cadherina P. Aumento original de 200x.

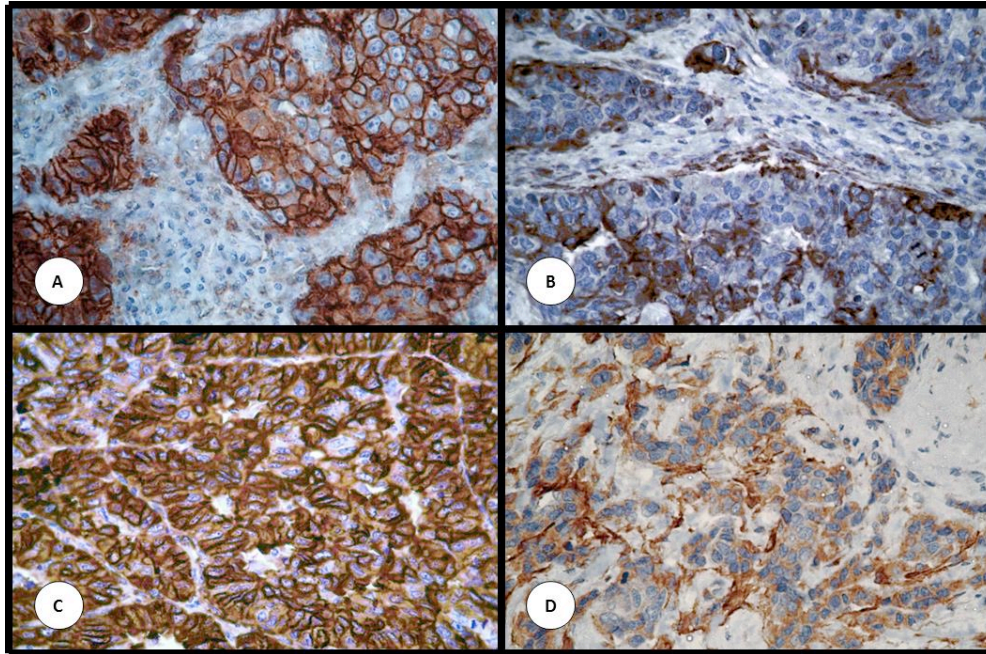


Figura 14. Expresión de proteínas estudiadas por inmunohistoquímica en matrices de tejidos. (A) p120. (B) Actina de músculo liso. (C) Alfa actina. (D) Calponina. Aumento original de 200x.

4.2. Análisis de la relación de las variables clínico-patológicas con las clases moleculares

Las características clínico patológicas y su relación con las clases moleculares se presentan en la Tabla 6. Se encontró una asociación estadísticamente significativa de las clases moleculares con las medias de edad, la edad en clases y el grado histológico (GH). Por el contrario, la edad de acuerdo a la menopausia y el estadio clínico no mostraron diferencias significativas.

En algunas clases moleculares y para algunas variables, tales como el estadio clínico I en las clases moleculares Luminal B, HER2 y TN, así como el GH I en las clases moleculares HER2 y TN, el número de casos muy bajo (una o dos pacientes). Esto fue debido a la poca cantidad de casos encontrados en este estudio para esas categorías.

		Luminal A	Luminal B	HER2	TN	P
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Edad	Media	52,73	51,11	52,75	48,75	<0,001
Rangos etarios	≤ 40	17 (11,3)	8 (11,1)	3 (9,4)	27 (27)	
	41-50	51 (34)	31 (43,1)	15 (46,9)	32 (32)	
	51-65	63 (42)	27 (37,5)	11 (34,4)	33 (33)	
	≥ 66	19 (12,7)	6 (8,3)	3 (9,4)	8 (8)	
	Total	150 (42,4)	72 (20,3)	32 (9)	100 (28,2)	0,041
Punto de corte 50	≤ 50	68 (45,3)	39 (54,2)	18 (56,3)	59 (59)	
	≥ 51	82 (54,7)	33 (45,8)	14 (43,8)	41 (41)	
	Total	150 (42,4)	72 (20,3)	32 (9)	100 (28,2)	0,172
Estadio clínico	I	5 (3,4)	1 (1,4)	1 (3,1)	2 (2)	
	II	63 (43,4)	21 (30)	5 (15,6)	28 (28)	
	III	71 (49)	44 (62,9)	23 (71,9)	66 (66)	
	IV	6 (4,1)	4 (5,7)	3 (9,4)	4 (4)	
	Total	145 (41,8)	70 (20,2)	32 (9,2)	100 (28,8)	0,078
Grado histológico	I	46 (30,7)	6 (8,3)	1 (3,1)	2 (2)	
	II	83 (55,3)	46 (63,9)	10 (31,3)	37 (37)	
	III	21 (14)	20 (27,8)	21 (65,6)	61 (61)	
	Total	150 (42,4)	72 (20,3)	32 (9)	100 (28,2)	<0,001

Tabla 6. Características clínico-patológicas y su asociación con las clases moleculares.

4.3. Análisis de la relación de los marcadores analizados por inmunohistoquímica con las clases moleculares

La expresión de los restantes marcadores (diferentes a RE, RP y HER2), de acuerdo a las clases moleculares, con sus respectivos porcentajes, así como el significado estadístico se muestran en la Tablas 7 a 9. En la Tabla 7, se observa como la expresión de C-Kit, CD10 y la media de Ki-67 para cada clase molecular, presentaron valor de $p < 0,05$, mientras que la expresión de EGFR, p63, survivina y ALDH-1, no mostraron relación significativa con las clases moleculares.

		Luminal A	Luminal B	Her2	TN	p
Marcador		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
EGFR	Negativo	139 (98,6)	66 (97,1)	31 (96,9)	90 (92,8)	0,123
	Positivo	2 (1,4)	2 (2,9)	1 (3,1)	7 (7,2)	
	Total	141 (41,7)	68 (20,1)	32 (9,5)	97 (28,7)	
C-Kit	Negativo	118 (94,4)	57 (95,0)	19 (86,4)	59 (75,6)	<0,001
	Positivo	7 (5,6)	3 (5,0)	3 (13,6)	19 (24,4)	
	Total	125 (43,9)	60 (21,1)	22 (7,7)	78 (27,4)	
p63	Negativo	120 (87,0)	53 (80,3)	20 (74,1)	74 (85,1)	0,306
	Positivo	18 (13,0)	13 (19,7)	7 (25,9)	13 (14,9)	
	Total	138 (43,4)	66 (20,8)	27 (8,5)	87 (27,4)	
Survivina	Negativo	21 (16,0)	11 (16,4)	4 (15,4)	16 (18,4)	0,968
	Positivo	110 (84,0)	56 (83,6)	22 (84,6)	71 (81,6)	
	Total	131 (42,1)	67 (21,5)	26 (8,4)	87 (28,0)	
ALDH-1	Negativo	94 (73,4)	42 (68,9)	22 (81,5)	62 (74,7)	0,654
	Positivo	34 (26,6)	19 (31,3)	5 (18,5)	21 (25,3)	
	Total	128 (42,8)	61 (20,4)	27 (9,0)	83 (27,8)	
CD10	Negativo	62 (93,9)	29 (100,0)	17 (89,5)	44 (81,5)	0,028
	Positivo	4 (6,1)	0 (0,0)	2 (10,5)	10 (18,5)	
	Total	66 (39,3)	29 (17,3)	19 (11,3)	54 (32,1)	
Ki-67	Media	19,3841	25,3086	29,9169	42,8413	<0,001
Ki-67	Bajo	61 (41,8)	17 (24,3)	6 (18,8)	8 (8,2)	<0,001
	Intermedio	45 (30,8)	22 (31,4)	7 (21,9)	19 (19,4)	
	Alto	40 (27,4)	31 (44,3)	19 (59,4)	71 (72,4)	
	Total	146 (42,2)	70 (20,2)	32 (9,2)	98 (28,3)	

Tabla 7. Expresión de marcadores de proliferación celular y otros y su asociación con las clases moleculares.

En la Tabla 8 se aprecia la relación estadísticamente significativa de la expresión de todos los filamentos intermedios analizados, CK5/6, CK8/18, CK14, CK17, CKAPM y vimentina con las clases moleculares. Se observa mayor expresión de citoqueratinas relacionadas con las

células basales/mioepiteliales, como CK5/6, CK14, CK17 y CKAPM en los tumores TN, al igual que la vimentina. La expresión de CK8/18 se presentó en todos los casos Luminal A, 98% de los tumores Luminal B, 96% de los HER2 y 93% de los TN.

		Luminal A	Luminal B	Her2	TN	p
Marcador		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
CK5/6	Negativo	139 (99,3)	59 (93,7)	29 (96,7)	73 (78,5)	
	Positivo	1 (0,7)	4 (6,3)	1 (3,3)	20 (21,5)	
	Total	140 (42,9)	63 (19,3)	30 (9,2)	93 (28,5)	<0,001
CK8/18	Negativo	0 (0)	1 (1,7)	1 (4)	6 (7)	
	Positivo	129 (100)	58 (98,3)	24 (96)	80 (93)	
	Total	129 (43,1)	59 (19,7)	25 (8,4)	86 (28,8)	0,018
CK14	Negativo	119 (100)	53 (94,6)	24 (100)	61 (79,2)	
	Positivo	0 (0)	3 (5,4)	0 (0)	16 (20,8)	
	Total	119 (43,1)	56 (20,3)	24 (8,7)	77 (27,9)	<0,001
CK17	Negativo	117 (98,3)	51 (92,7)	22 (100)	58 (73,4)	
	Positivo	2 (1,7)	4 (7,3)	0 (0)	21 (26,6)	
	Total	119 (43,3)	55 (20,0)	22 (100)	79 (28,7)	<0,001
CK APM	Negativo	29 (45,3)	16 (50,0)	3 (15,8)	11 (19,6)	
	Positivo	35 (54,7)	16 (50,0)	16 (84,2)	45 (80,4)	
	Total	64 (37,4)	32 (18,7)	19 (11,1)	56 (32,7)	0,002
Vimentina	Negativo	114(91,2)	53(89,8)	22(78,6)	28(32,9)	
	Positivo	11 (8,8)	6 (10,2)	6 (21,4)	57 (67,1)	
	Total	125 (42,1)	59 (19,9)	28 (9,4)	85 (28,6)	<0,001

APM = alto peso molecular.

Tabla 8. Expresión de diferentes filamentos intermedios y su asociación con las clases moleculares.

La relación de las clases moleculares con la expresión de los marcadores de adhesión celular y citoesqueleto se muestra en la Tabla 9. No se evidenció asociación significativa con la expresión de p120 y calponina, mientras si se presentó tal relación con la expresión de cadherina P, la actina de músculo liso y la alfa-actina con los tumores triple negativo. La expresión de cadherina E también se relacionó, aunque en este caso fue la ausencia de expresión, con los tumores de fenotipo TN.

		Luminal A	Luminal B	Her2	TN	p
Marcador		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Cadherina E	Negativo	25 (18,8)	18 (28,1)	3 (11,5)	36 (42,9)	
	Positivo	108 (81,2)	46 (71,9)	23 (88,5)	48 (57,1)	
	Total	133 (43,3)	64 (20,8)	26 (8,5)	84 (27,4)	<0,001
Cadherina P	Negativo	118 (84,3)	44 (66,7)	9 (30)	23 (25,6)	
	Positivo	22 (15,7)	22 (33,3)	21 (70)	67 (74,4)	
	Total	140 (42,9)	66 (20,2)	30 (9,2)	90 (27,6)	<0,001
p120	Negativo	6 (10,5)	1 (4,2)	1 (6,7)	3 (6,4)	
	Positivo	51 (89,5)	23 (95,8)	14 (93,3)	44 (93,6)	
	Total	57 (39,9)	24 (16,8)	15 (10,5)	47 (32,9)	0,753
Actina ML	Negativo	55 (100)	25 (100)	15 (93,8)	42 (87,5)	
	Positivo	0 (0)	0 (0)	1 (6,3)	6 (12,5)	
	Total	55 (38,2)	25 (17,4)	16 (11,1)	48 (33,3)	0,017
Alfa-actina	Negativo	41 (100)	17 (100)	15 (100)	29 (80,6)	
	Positivo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	7 (19,4)	
	Total	41 (37,6)	17 (15,6)	15 (13,8)	36 (33,0)	0,002
Calponina	Negativo	104 (90,4)	45 (88,2)	20 (95,2)	67 (85,9)	
	Positivo	11 (9,6)	6 (11,8)	1 (4,8)	11 (14,1)	
	Total	115 (43,4)	51 (19,2)	21 (7,9)	78 (29,4)	0,597

ML = músculo liso

Tabla 9. Expresión de marcadores de adhesión celular y citoesqueleto y su asociación con las clases moleculares.

4.4. Análisis de la supervivencia de la serie

4.4.1. Análisis de la supervivencia en relación a las variables clínico-patológicas

En cuanto a la edad de las pacientes agrupadas en clases, se apreció una peor supervivencia global (SG) para las pacientes con edades igual o menor a 40 años, con respecto a los otros grupos de edades mayores ($p=0,016$) (Figura 15). La SG media para el grupo de las pacientes con edad <40 fue de $38,6 \pm 2,5$ meses, comparado con $46,8 \pm 1,5$ meses para el grupo de 41 a 50 años, $48,5 \pm 1,4$ meses para el grupo de 51 a 65 años y $46,9 \pm 2,5$ para las mayores de 66 años. Aunque se observó una peor supervivencia para las pacientes menores de 50 años, la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,110$), con SG media de $44,4 \pm 1,3$ para ellas y de $48,2 \pm 1,2$ para las pacientes iguales o mayores de 51 años.

A pesar de los pocos casos de esta serie en estadios clínicos (EC) I y IV, las curvas de supervivencia para cada estadio mostraron diferencias significativas, con $p<0,001$ (Figura 16).

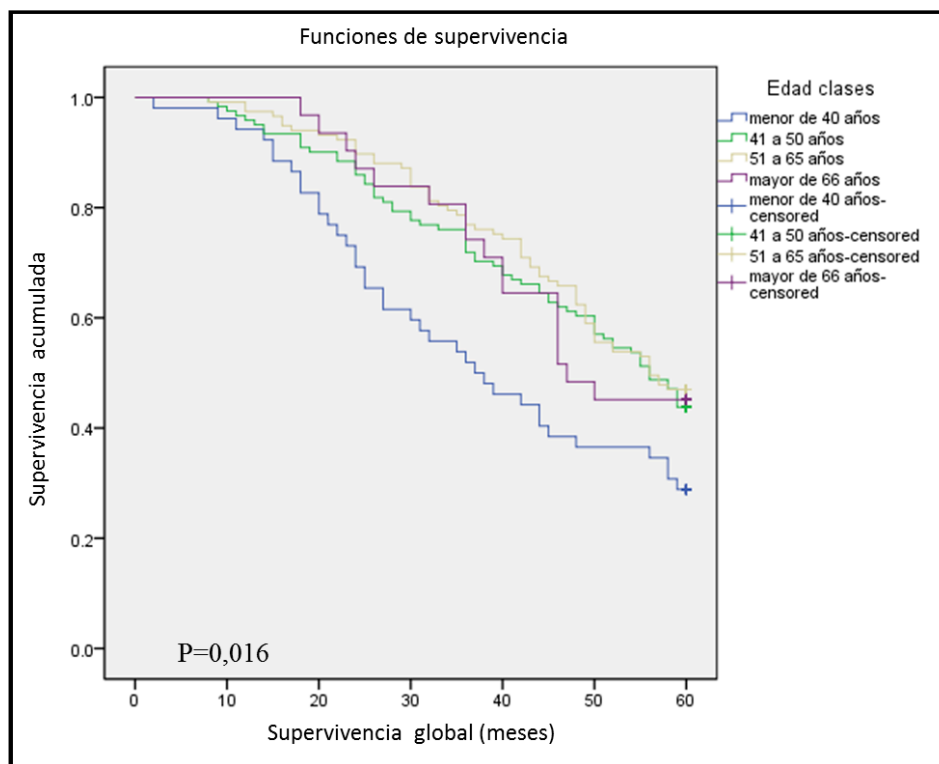


Figura 15. Supervivencia de Kaplan Meier según la edad por clases.

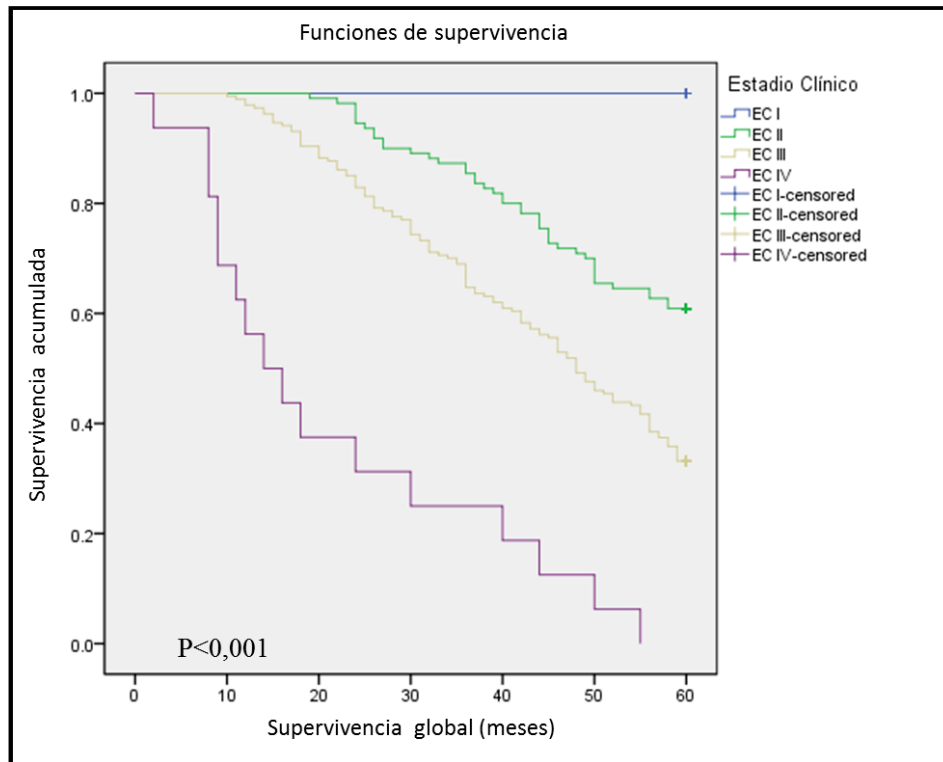


Figura 16. Supervivencia de Kaplan Meier según el estadio clínico.

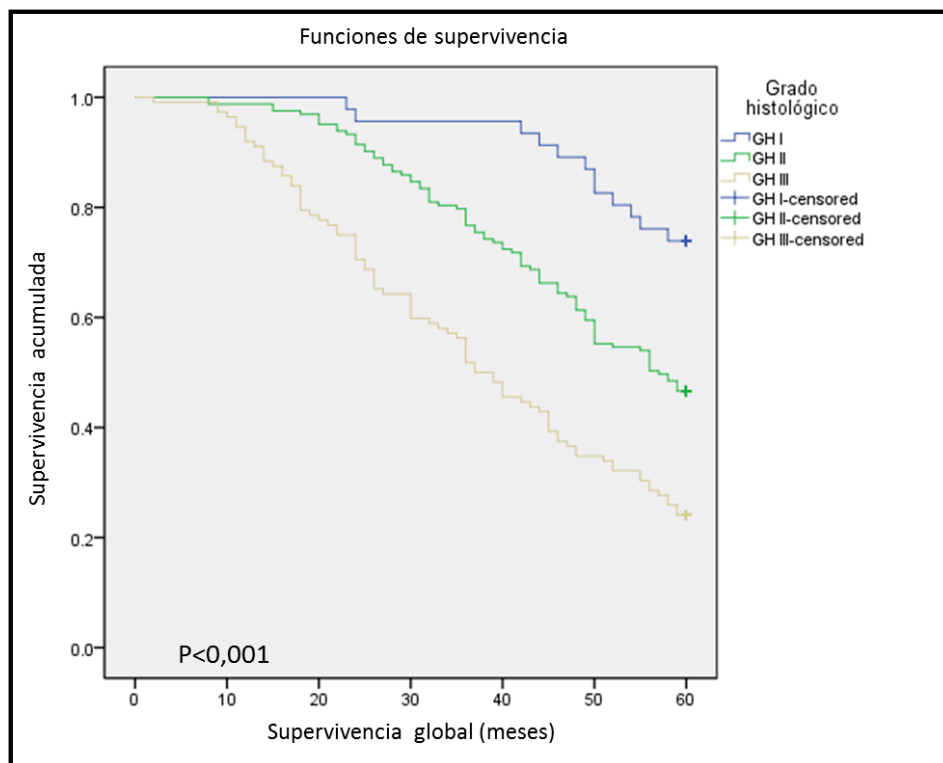


Figura 17. Supervivencia de Kaplan Meier según el grado histológico del tumor.

El grado histológico (GH) presentó una asociación significativa con la supervivencia ($p < 0,001$), con SG media de $56,2 \pm 1,2$ meses para el GH I; $48,6 \pm 1,1$ meses para el GH II y $38,3 \pm 1,7$ meses para el GH III (Figura 17).

4.4.2. Análisis de la supervivencia en relación a la expresión de los marcadores moleculares analizados

4.4.2.1. Marcadores varios y de proliferación celular

En la Tabla 10 se aprecia la relación de los marcadores denominados como varios, con la media de la supervivencia global (SG), observándose diferencias estadísticamente significativas para los casos con expresión de EGFR, C-Kit, p63, CD10 y las diferentes clases de Ki-67.

Marcador		Supervivencia global (media de meses \pm DE)	p
EGFR	Negativo	$46,3 \pm 0,9$	0,011
	Positivo	$34,8 \pm 5,1$	
C-Kit	Negativo	$46,7 \pm 1$	<0,001
	Positivo	$35,3 \pm 3$	
p63	Negativo	$46,8 \pm 1$	0,014
	Positivo	$42,5 \pm 2,1$	
Survivina	Negativo	$49,7 \pm 2,1$	0,082
	Positivo	$44,6 \pm 1,1$	
ALDH-1	Negativo	$45,4 \pm 1,1$	0,388
	Positivo	$46,8 \pm 1,8$	
CD10	Negativo	$47,4 \pm 1,3$	0,033
	Positivo	$38,7 \pm 4,2$	
Ki-67	Bajo	$57,5 \pm 0,8$	<0,001
	Intermedio	$50,5 \pm 1,4$	
	Alto	$37,1 \pm 1,4$	

Tabla 10. Supervivencia global media en relación a la expresión del grupo de marcadores varios y de proliferación celular.

4.4.2.2. Filamentos intermedios

En la Tabla 11 se muestra la relación de diferentes filamentos intermedios con la media de supervivencia global, observándose diferencias estadísticamente significativas para los casos con expresión de CK5/6, CK14, CK17 y vimentina.

Marcador		Supervivencia global (media de meses \pm DE)	p
CK5/6	Negativo	46,8 \pm 0,9	0,007
	Positivo	33,7 \pm 4	
CK8/18	Negativo	42,8 \pm 4,4	0,307
	Positivo	45,9 \pm 1	
CK14	Negativo	46,5 \pm 1	<0,001
	Positivo	30,3 \pm 4,5	
CK17	Negativo	46,7 \pm 1	<0,001
	Positivo	33,2 \pm 3,6	
CK APM	Negativo	48,4 \pm 1,9	0,121
	Positivo	45 \pm 1,5	
Vimentina	Negativo	49,9 \pm 1	<0,001
	Positivo	33,6 \pm 1,8	

APM = alto peso molecular.

Tabla 11. Supervivencia global media en relación a la expresión del grupo de filamentos intermedios.

4.4.2.3. Marcadores de adhesión celular y citoesqueleto

La relación de los marcadores de adhesión celular y del citoesqueleto con la media de SG se presenta en la Tabla 12; se evidencian diferencias estadísticamente significativas para los casos con expresión de cadherina P, actina muscular y calponina.

Marcador		Supervivencia global (media de meses \pm DE)	p
Cadherina E	Negativo	43,727 \pm 1,777	0,090
	Positivo	46,172 \pm 1,130	
Cadherina P	Negativo	50,846 \pm 0,942	<0,001
	Positivo	39,300 \pm 1,582	
p120	Negativo	50,091 \pm 4,412	0,494
	Positivo	46,530 \pm 1,364	
Actina ML	Negativo	47,241 \pm 1,315	0,027
	Positivo	35,571 \pm 6,171	
Alfa-actina	Negativo	46,422 \pm 1,526	0,066
	Positivo	36,714 \pm 6,259	
Calponina	Negativo	46,485 \pm 1,064	0,023
	Positivo	39,345 \pm 3,139	

ML = músculo liso

Tabla 12. Supervivencia global media en relación a la expresión del grupo de marcadores de adhesión celular y citoesqueleto.

4.4.3. Análisis de la supervivencia en relación a las clases moleculares

En cuanto a las diferentes clases moleculares, se observó mejor supervivencia para el tipo Luminal A, seguido del tipo Luminal B y prácticamente emparejadas con peor supervivencia los tipos HER2 y TN (Figura 18).

La SG media fue de $51,6 \pm 1$ meses para la clase Luminal A; de $47,3 \pm 1,9$ meses para los Luminal B; de $39,5 \pm 3,2$ meses para la clase HER2 y $38,9 \pm 1,9$ meses para los TN ($p < 0,001$).

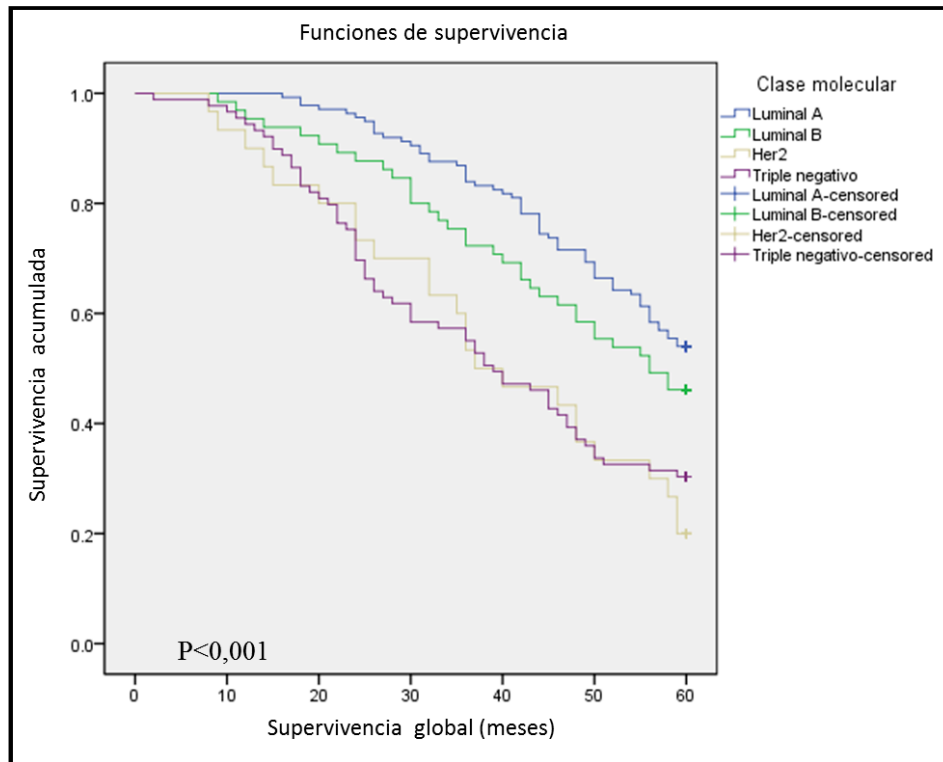


Figura 18. Supervivencia de Kaplan Meier según la clase molecular.

4.4.4. Análisis de la supervivencia en relación a las variables clínico-patológicas y la clase molecular

No se observaron diferencias significativas de la SG al relacionar la edad y las clases moleculares. En cambio, la SG y el estadio clínico presentaron asociación significativa con las clases Luminal A, Luminal B y HER2. El grado histológico, por su parte, presentó diferencias significativas en la SG solo en las clases Luminal A y B (Tabla 13).

Se presentaron algunas categorías en donde todos los casos fueron eliminados para el análisis de SG, puesto que las pacientes abandonaron el seguimiento antes de los 60 meses o en las cuales no se produjo el fallecimiento en ese tiempo. En esos casos lógicamente no se calcularon los valores de SG media.

		Luminal A	Luminal B	HER2	TN
Supervivencia global en media de meses \pm DE					
Edad en clases	≤ 40 a	48,1 \pm 3,5	41,5 \pm 6,9	34,3 \pm 8,1	32,2 \pm 3,6
	41 – 50 a	51,6 \pm 1,7	47,8 \pm 3	40,5 \pm 5,3	41,1 \pm 3,3
	51 – 65 a	52,7 \pm 1,5	47,7 \pm 2,8	39,6 \pm 5,4	43,5 \pm 3,3
	≥ 66 a	51,7 \pm 3,3	51 \pm 6	39,3 \pm 4,1	36,3 \pm 4,5
	p	0,603	0,502	0,542	0,138
Edad	≤ 50 a	50,7 \pm 1,6	46,4 \pm 2,8	39,4 \pm 4,6	37 \pm 2,5
	≥ 51 a	52,5 \pm 1,4	48,3 \pm 2,6	39,5 \pm 4,1	42,1 \pm 2,8
	p	0,295	0,741	0,672	0,418
Estadio clínico	I	----	----	----	----
	II	55,3 \pm 1,2	54,2 \pm 2,4	43,3 \pm 4,9	43,7 \pm 3
	III	49,4 \pm 1,6	46,1 \pm 2,3	41,8 \pm 3,5	37,7 \pm 2,4
	IV	33,8 \pm 6,3	10,7 \pm 0,9	10,3 \pm 1,9	21 \pm 10,7
	p	<0,001	<0,001	<0,001	0,061
Grado histológico	I	55,7 \pm 1,5	58 \pm 1,8	----	----
	II	50,4 \pm 1,4	51,4 \pm 2	39,7 \pm 5,8	43,7 \pm 2,8
	III	49 \pm 3,2	35,5 \pm 3,9	38,3 \pm 3,9	35,3 \pm 2,5
	p	0,045	<0,001	0,412	0,059

Las celdas sin datos corresponden a estratos sin casos o con todos los casos censurados

Tabla 13. Supervivencia global en relación a las variables clínico-patológicas y la clase molecular.

4.4.5. Análisis de la supervivencia en relación a la expresión de los marcadores moleculares analizados por inmunohistoquímica y la clase molecular

4.3.5.1. Análisis de la supervivencia en relación a la expresión de marcadores varios y la clase molecular

Al relacionar la SG en cada clase molecular según la expresión de los diferentes marcadores, se observó una relación de la expresión de EGFR en la clase Luminal B con SG significativamente menor para las pacientes cuyos tumores presentaron ese marcaje; igualmente la expresión de C-Kit en las clases Luminal B y TN se asoció con menor SG, así

como la expresión de p63 en la clase HER2; y de los distintos grupos de expresión de Ki-67 con las cuatro clases moleculares. En todos estos marcadores, su expresión, o en el caso del Ki-67 el mayor porcentaje de células positivas, se asoció con peor supervivencia (Tabla 14).

		Luminal A	Luminal B	HER2	TN
Marcador		Supervivencia global en media de meses \pm DE			
EGFR	Negativo	51,6 \pm 1,1	48,2 \pm 1,9	39,1 \pm 3,3	39,1 \pm 2
	Positivo	51 \pm 6,4	11,5 \pm 2,5	50 \pm 0	34,6 \pm 6,1
	p	0,888	<0,001	0,958	0,393
C-Kit	Negativo	50,7 \pm 1,2	47,7 \pm 2,1	36,9 \pm 4,4	41 \pm 2,3
	Positivo	54,6 \pm 2,8	31 \pm 3,6	36,3 \pm 6,9	28,7 \pm 3,8
	p	0,467	0,007	0,550	0,006
p63	Negativo	52,1 \pm 1,2	47,6 \pm 2,2	44,3 \pm 4,1	38,7 \pm 2,2
	Positivo	48,7 \pm 2,8	45 \pm 4,3	35,7 \pm 5,6	35,5 \pm 4,3
	p	0,079	0,847	0,047	0,340
Survivina	Negativo	54 \pm 2,3	49,4 \pm 4,8	56,5 \pm 2,5	43,2 \pm 4,2
	Positivo	50,4 \pm 1,3	46,7 \pm 2,2	36,5 \pm 3,9	36,8 \pm 2,2
	p	0,254	0,681	0,194	0,174
ALDH-1	Negativo	50,2 \pm 1,4	46,5 \pm 2,6	39,6 \pm 3,8	39,6 \pm 2,3
	Positivo	54,1 \pm 1,9	47,2 \pm 3,5	34,6 \pm 6,9	37,5 \pm 3,6
	p	0,183	0,698	0,671	0,479
CD10	Negativo	52,9 \pm 1,4	48,2 \pm 2,8	45,2 \pm 4	40,1 \pm 2,6
	Positivo	44,8 \pm 8,6	----	34 \pm 2	37,2 \pm 5,6
	p	0,483	---	0,115	0,505
Ki-67	Bajo	58,7 \pm 0,6	54,5 \pm 2,2	51,7 \pm 7,2	58,8 \pm 1,2
	Intermedio	49,8 \pm 2	51,6 \pm 2,9	50 \pm 4	50,9 \pm 3,1
	Alto	42,9 \pm 2,1	40,4 \pm 3,2	31,9 \pm 3,6	33,6 \pm 2,1
	p	<0,001	0,020	0,006	<0,001

Las celdas sin datos corresponden a estratos sin casos o con todos los casos censurados

Tabla 14. Supervivencia global en base a la expresión de marcadores varios y de proliferación celular y la clase molecular.

4.4.5.2. Análisis de la supervivencia en relación a la expresión de diferentes filamentos intermedios y la clase molecular

En la Tabla 15 se evidencia la asociación estadísticamente significativa de la expresión de CK5/6 con una supervivencia menor en las clases Luminal B y HER2; del mismo modo, la expresión de CK14 en la clase TN; la expresión de CK17 en las clases Luminal B y TN; y de la vimentina en las clases Luminal A y TN.

		Luminal A	Luminal B	HER2	TN
Marcador		Supervivencia global en media de meses \pm DE			
CK5/6	Negativo	51,6 \pm 1,1	47,8 \pm 2	39,9 \pm 3,2	39,5 \pm 2,1
	Positivo	29 \pm 0	37,3 \pm 9,2	8 \pm 0	34,6 \pm 4,7
	p	0,003	0,255	<0,001	0,781
CK8/18	Negativo	----	48 \pm 0	----	39 \pm 4,7
	Positivo	51,1 \pm 1,1	47,8 \pm 2	----	38,3 \pm 2
	p	----	0,490	0,217	0,744
CK14	Negativo	51,1 \pm 1,2	47,7 \pm 2,1	38,5 \pm 3,8	39,6 \pm 2,2
	Positivo	-----	35 \pm 12	----	29,4 \pm 4,8
	p	----	0,400	----	0,044
CK17	Negativo	51,1 \pm 1,1	47,6 \pm 2,2	37,2 \pm 4	40,4 \pm 2,3
	Positivo	56 \pm 0	31,3 \pm 7,9	----	32,4 \pm 4,1
	p	0,580	0,011	----	0,046
CK APM	Negativo	49,5 \pm 2,7	51,3 \pm 2,8	45,3 \pm 6,1	42,6 \pm 5
	Positivo	54,1 \pm 1,5	43,7 \pm 4,1	42,7 \pm 4,1	39,2 \pm 2,6
	p	0,768	0,257	0,826	0,599
Vimentina	Negativo	52,5 \pm 1,1	47,7 \pm 2,1	42,1 \pm 4,1	49,8 \pm 2,5
	Positivo	35,8 \pm 4	43,8 \pm 7,4	36,7 \pm 6,3	31,7 \pm 2,2
	p	<0,001	0,067	0,113	<0,001

Las celdas sin datos corresponden a estratos sin casos o con todos los casos censurados
APM = alto peso molecular.

Tabla 15. Supervivencia global en base a la expresión de diferentes filamentos intermedios y la clase molecular.

4.4.5.3. Análisis de la supervivencia en relación a la expresión de marcadores de adhesión celular y citoesqueleto con la clase molecular

La expresión de cadherina E solo presentó asociación estadística significativa con la clase molecular Luminal B, en el sentido que las pacientes con tumores con expresión ausente o reducida presentaron menor supervivencia media (Tabla 16).

		Luminal A	Luminal B	Her2	TN
Marcador		Supervivencia global en media de meses \pm DE			
Cadherina E	Negativo	50,3 \pm 2,3	44,3 \pm 3,9	36 \pm 2,3	39,7 \pm 2,9
	Positivo	51,3 \pm 1,3	48,4 \pm 2,3	39,5 \pm 3,8	35,5 \pm 2,7
	p	0,462	0,044	0,338	0,319
Cadherina P	Negativo	51,7 \pm 1,2	51,4 \pm 1,8	46,9 \pm 4,6	46,8 \pm 3,2
	Positivo	50,7 \pm 2,5	40,6 \pm 4	36,9 \pm 4,1	35,8 \pm 2,2
	p	0,270	0,085	0,399	0,043
p120	Negativo	51 \pm 4,8	----	15 \pm 0	56,7 \pm 2,7
	Positivo	52,4 \pm 1,7	----	45,1 \pm 4,2	40,1 \pm 2,6
	p	0,596	0,368	0,016	0,205
Actina ML	Negativo	51,9 \pm 1,7	49 \pm 2,7	43,3 \pm 4,3	41,5 \pm 2,7
	Positivo	----	----	36 \pm 0	35,5 \pm 7,2
	p	----	----	0,396	0,371
Alfa-actina	Negativo	51 \pm 2	46,5 \pm 3,4	42 \pm 4,3	42,2 \pm 3,1
	Positivo	----	----	----	36,7 \pm 6,3
	p	----	----	----	0,360
Calponina	Negativo	52,7 \pm 1,1	46,9 \pm 2,5	----	39,4 \pm 2,2
	Positivo	43,1 \pm 4,4	47 \pm 6,1	----	29,5 \pm 4,6
	p	0,012	0,989	0,181	0,056

Las celdas sin datos corresponden a estratos sin casos o con todos los casos censurados

ML = músculo liso

Tabla 16. Supervivencia global en base a la expresión de marcadores de adhesión celular y citoesqueleto y la clase molecular.

La expresión de cadherina P presentó relación estadísticamente significativa con la clase TN; la expresión de p120 con la clase HER2; y la expresión de calponina con la clase Luminal A. La expresión de estas moléculas se asoció con una media de SG menor.

4.4.6. Análisis de la supervivencia en relación a la expresión de marcadores moleculares analizados por inmunohistoquímica y los subtipos de las clases moleculares

4.4.6.1. Clase Luminal A

Como se ha comentado previamente, el índice de proliferación (Ki-67) fue determinante en la evolución de esta clase molecular. Si se divide en dos grupos con un punto de corte del 14%, se obtiene una SG media de $58,7 \pm 0,6$ meses para los que presentaron un $\leq 14\%$ y de $46,5 \pm 1,5$ para $>14\%$, con $p < 0,001$. Del mismo modo, al establecer el punto de corte en el 25% se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas $p < 0,001$, aunque con un valor de chi cuadrado menor. La SG fue en este caso de 55 ± 1 para los tumores con un índice de proliferación $< 25\%$ y de $42,9 \pm 2,1$ para los tumores con un índice de proliferación $\geq 25\%$ (Figuras 19 y 20).

En cuanto a la relación entre la supervivencia y los subtipos de cada clase molecular para marcadores con posible significación pronóstica particular, se encontraron diferencias significativas para la clase Luminal A según la expresión de marcadores relacionados con el tipo basal. La SG media fue de $54,3 \pm 1$ meses para los casos sin expresión de marcadores basales y de $42,2 \pm 1,2$ meses para los casos que presentaron expresión de uno o varios marcadores basales ($p < 0,001$) (Figura 21).

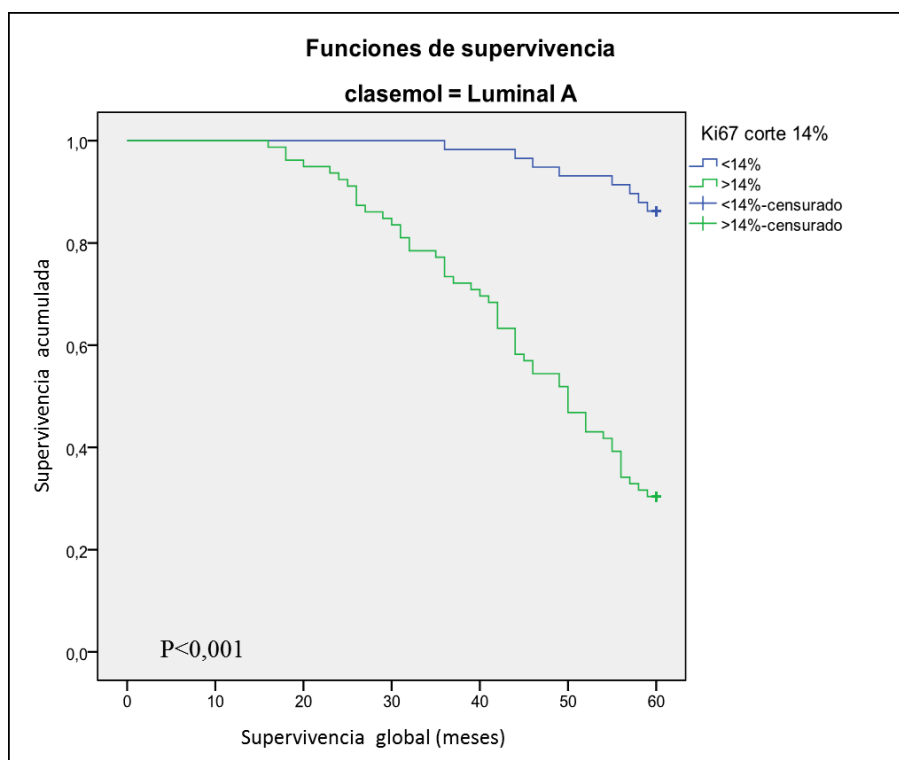


Figura 19. Relación entre la supervivencia global y clase Luminal A según el porcentaje de expresión de Ki-67 con punto de corte en 14%.

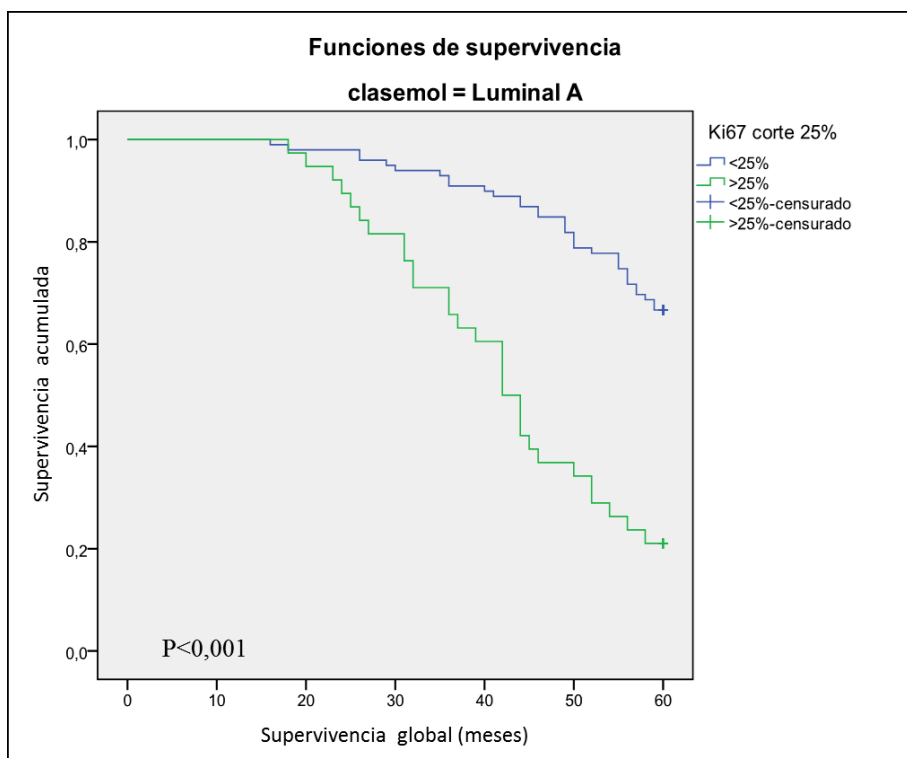


Figura 20. Relación entre la supervivencia global y clase Luminal B según el porcentaje de expresión de Ki-67 con punto de corte en 25%.

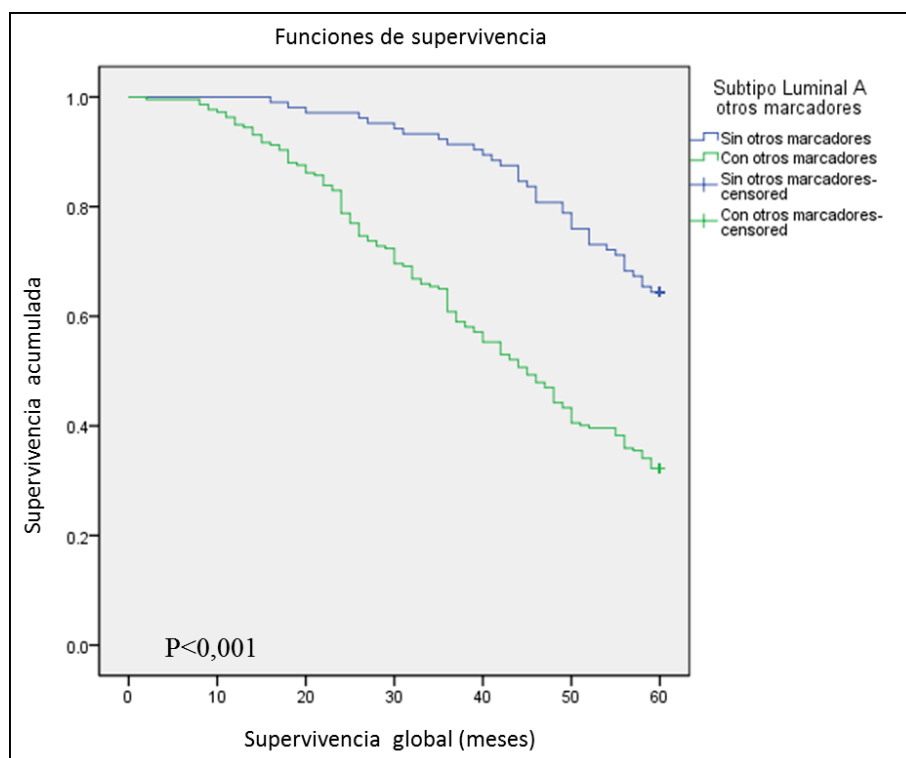


Figura 21. Relación entre la supervivencia global y la clase Luminal A según la expresión de marcadores de tipo basal.

4.4.6.2. Clase Luminal B

La expresión de Ki-67 permite separar dos grupos con SG media diferentes, con punto de corte en 25%. Los tumores con un índice de proliferación $\leq 25\%$ presentaron una SG media de $52,8 \pm 1,2$ meses frente a $40,4 \pm 3,2$ meses para los tumores con un índice de proliferación $>25\%$ ($p=0,005$). Con el punto de corte en 14% las diferencias en la SG no fueron estadísticamente significativas ($p=0,145$), a pesar de una SG de $54,5 \pm 2,2$ y $45,1 \pm 2,4$ para los casos con índices de proliferación $\leq 14\%$ y $>14\%$ respectivamente (Figuras 22 y 23).

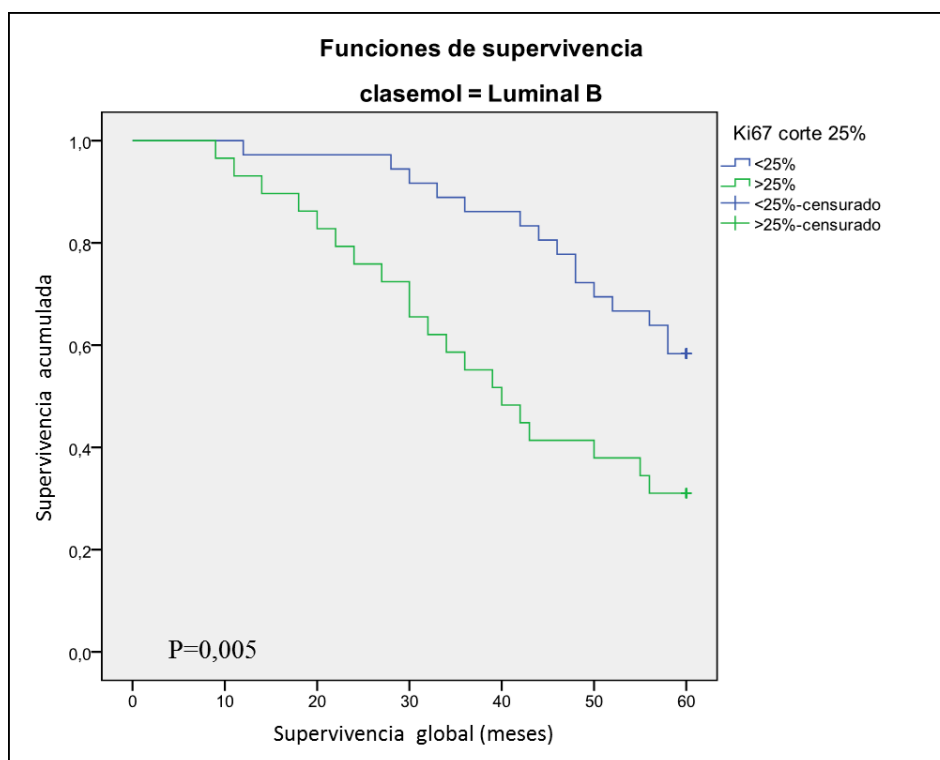


Figura 22. Relación entre la supervivencia global y clase Luminal B según el porcentaje de expresión de Ki-67 con punto de corte en 25%.

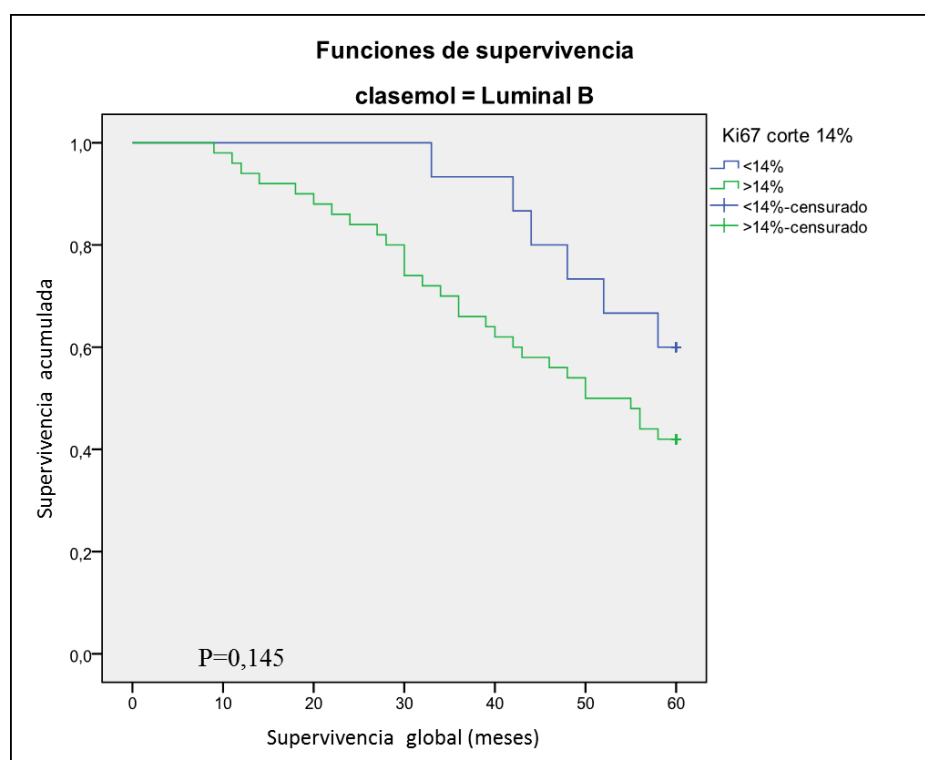


Figura 23. Relación entre la supervivencia global y clase Luminal B según el porcentaje de expresión de Ki-67 con punto de corte en 14%.

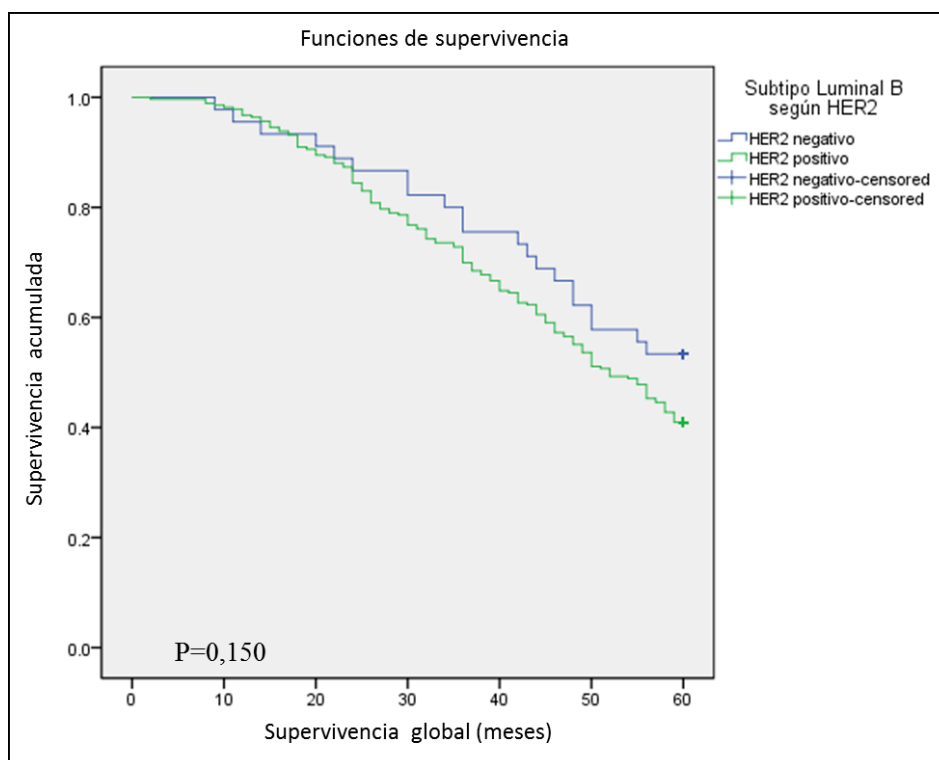


Figura 24. Relación entre la supervivencia global y clase Luminal B según la expresión de HER2.

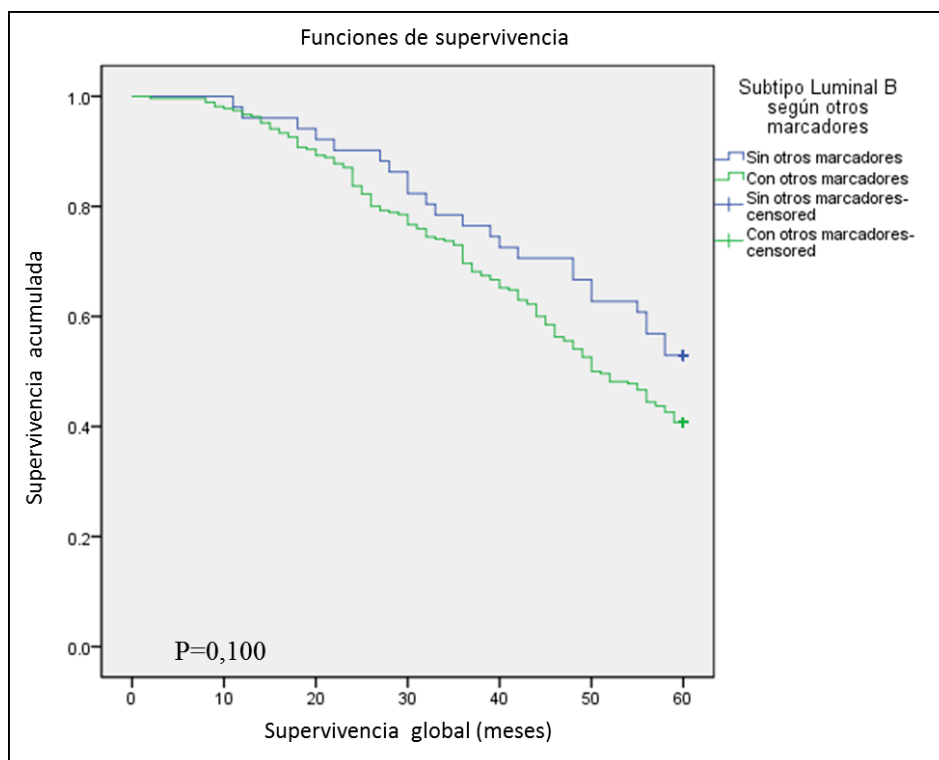


Figura 25. Relación entre la supervivencia global y clase Luminal B según la expresión de marcadores de tipo basal.

Para esta clase molecular no se lograron obtener diferencias significativas entre los casos que expresaron HER2 comparados con los que no lo hicieron (SG media en meses de $48,6 \pm 2,3$ vs $45,7 \pm 1$; $p=0,150$), ni al agrupar a los casos con expresión de marcadores basales (SG media en meses de $49,4 \pm 2,1$ vs $45,5 \pm 1$; $p=0,100$) (Figuras 24 y 25).

4.4.6.3. Clase HER2

El índice de proliferación (Ki-67) mostró diferencias estadísticamente significativas para la SG tanto estableciendo el punto de corte en 14%, con una SG media de $51,7 \pm 7,2$ meses para los que presentaron un índice de proliferación $\leq 14\%$ y de $36,4 \pm 3,3$ para los tumores con un índice de proliferación $>14\%$ ($p=0,030$), como cuando el corte era del 25%. La SG media fue en este caso de $50,8 \pm 4,1$ para los tumores con un índice de proliferación $\leq 25\%$ y de $31,9 \pm 3,6$ ($p=0,002$) para aquellos tumores con un índice de proliferación $>25\%$ (Figuras 26 y 27).

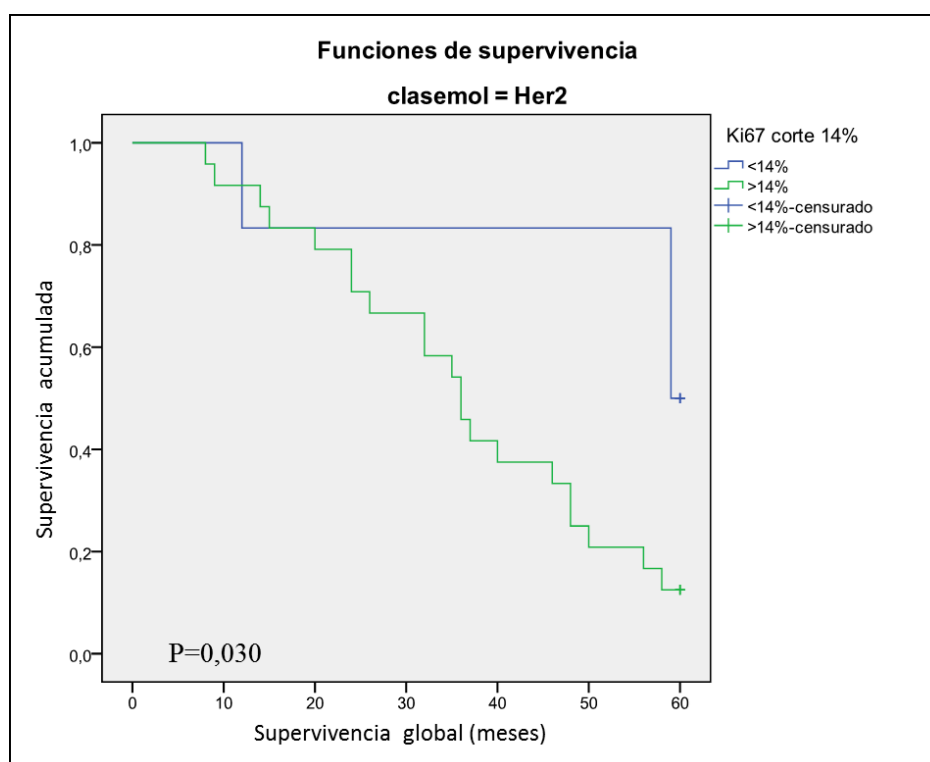


Figura 26. Relación entre la supervivencia global y clase HER2 según el porcentaje de expresión de Ki-67 con punto de corte en 14%.

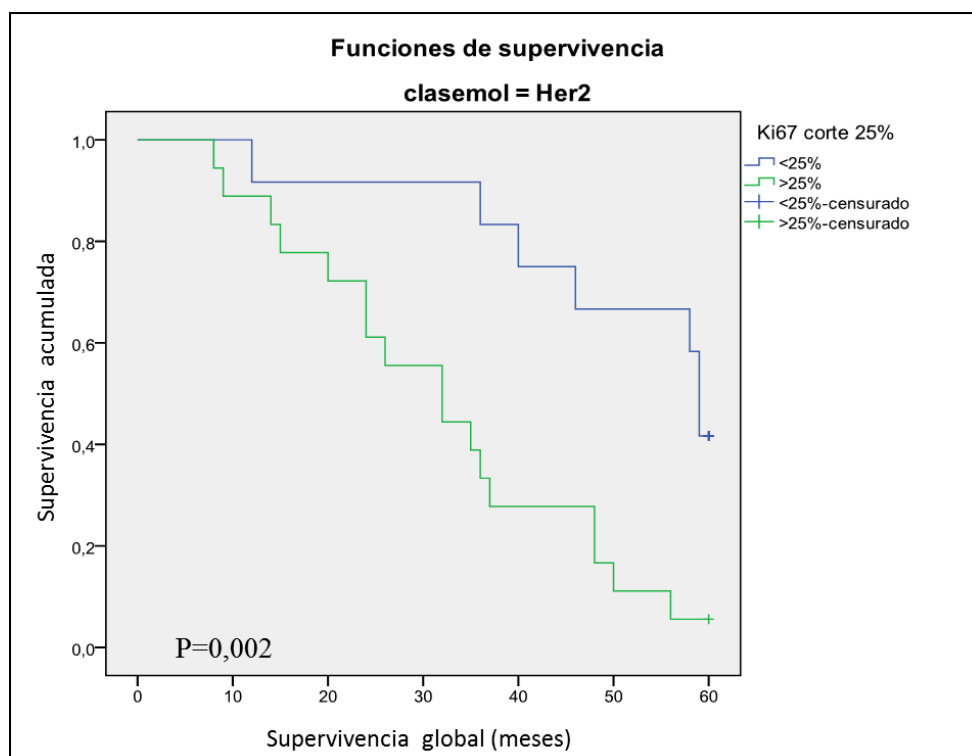


Figura 27. Relación entre la supervivencia global y clase HER2 según el porcentaje de expresión de Ki-67 con punto de corte en 25%.

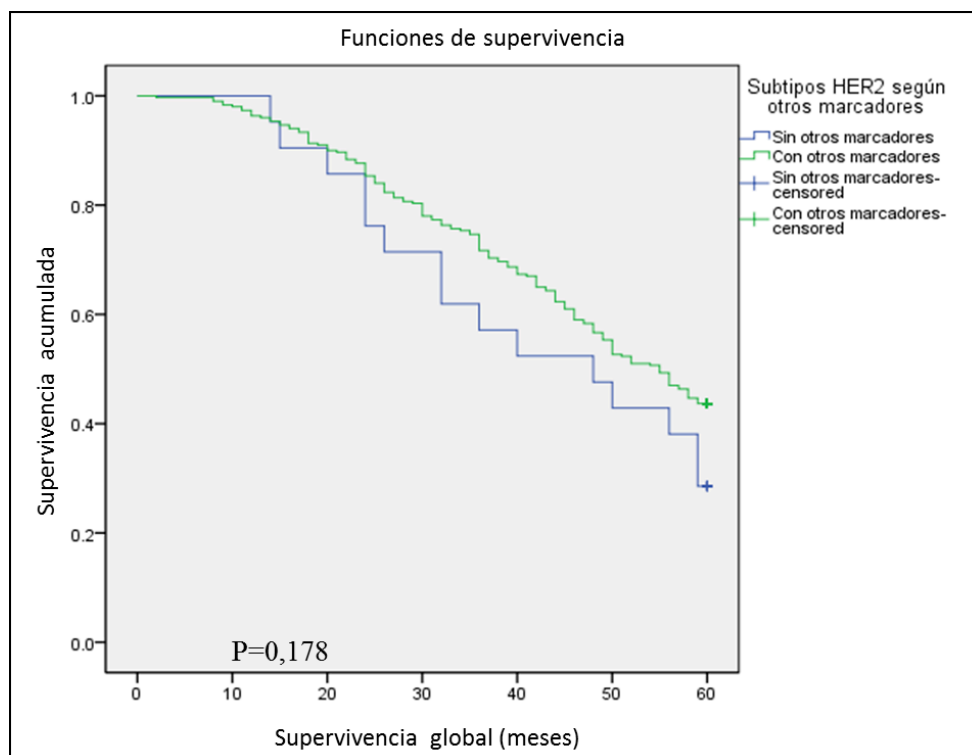


Figura 28. Relación entre la supervivencia global y clase HER2 según la expresión de marcadores de tipo basal.

No se apreciaron diferencias significativas entre los casos que expresaron marcadores basales y aquellos que no (SG media en meses de $46,4 \pm 0,9$ vs $42,6 \pm 3,7$; $p=0,178$) (Figura 28).

4.4.6.4. Clase Triple negativo

El índice de proliferación (Ki-67) mostró diferencias estadísticamente significativas para la SG tanto con punto de corte en el 14%, con una SG media de $58,8 \pm 1,2$ meses para los tumores que presentaron un índice de proliferación $\leq 14\%$ y de $37 \pm 1,9$ para los tumores con un índice de proliferación $>14\%$ ($p=0,003$), como cuando el punto de corte se establece en el 25%. La SG media fue en este caso de $53,5 \pm 2,3$ para los tumores que presentaron un índice de proliferación $\leq 25\%$ y de $33,6 \pm 2,1$ ($p<0,001$) para los tumores con un índice de proliferación $>25\%$ (Figuras 29 y 30). Sin embargo, en esta clase se presentaron solamente 8 casos con un índice de proliferación $\leq 14\%$ frente a 81 casos con un índice de proliferación $>14\%$.

La expresión de marcadores basales influyó significativamente en la SG, con media de $34,3 \pm 2$ meses comparada con una media de SG de $55,5 \pm 2$ meses para aquellos casos sin expresión de marcadores basales ($p<0,001$) (Figura 31).

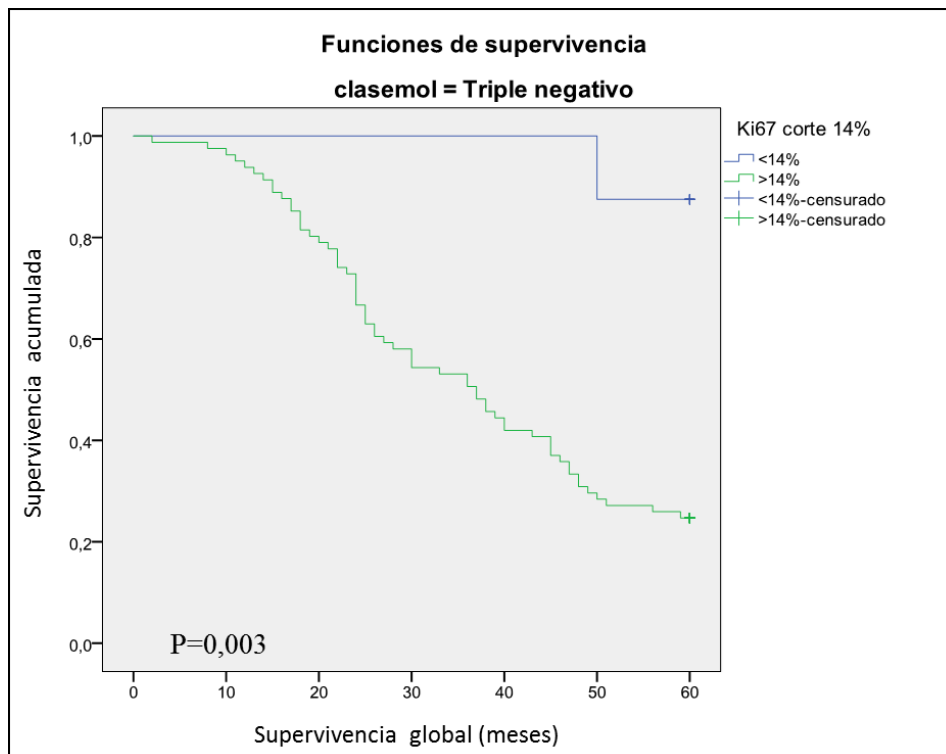


Figura 29. Relación entre la supervivencia global y clase TN según el porcentaje de expresión de Ki-67 con punto de corte en 14%.

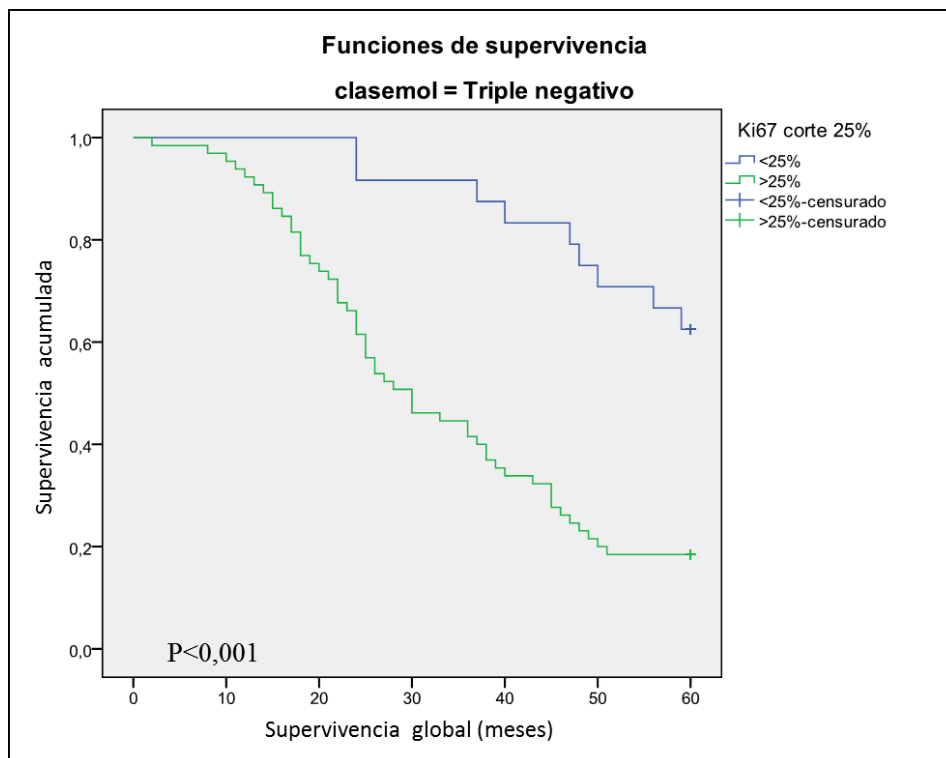


Figura 30. Relación entre la supervivencia global y clase TN según el porcentaje de expresión de Ki-67 con punto de corte en 25%.

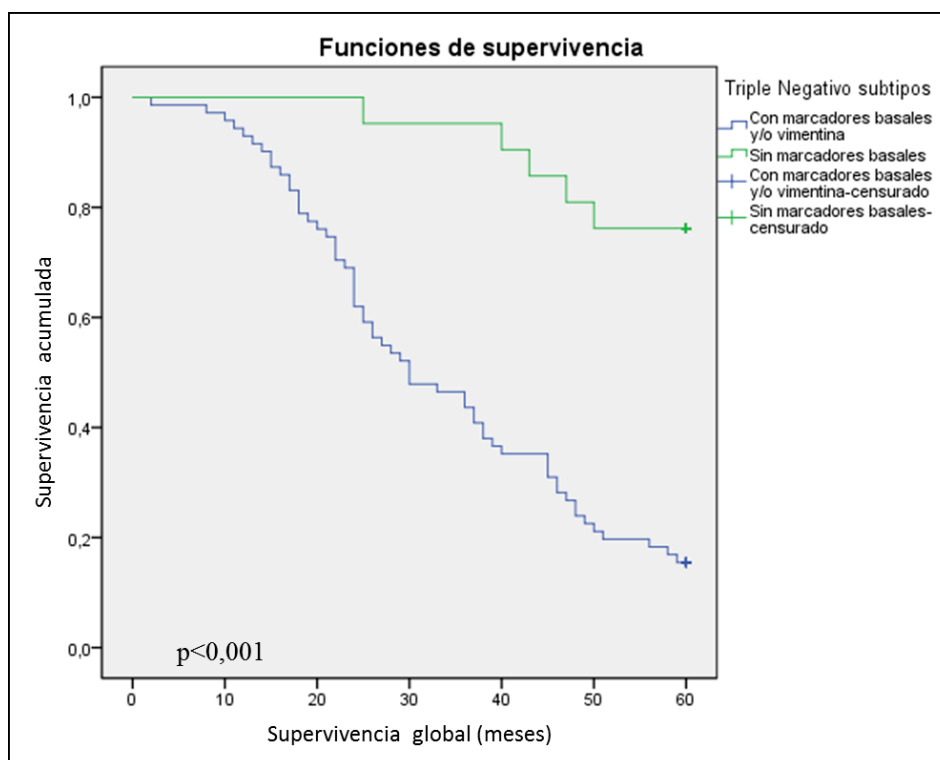


Figura 31. Relación entre la supervivencia global y clase TN según la expresión de marcadores de tipo basal y vimentina.

4.5. Análisis multivariante

El análisis multivariante de regresión de Cox de las variables clínico-patológicas y de la expresión de las moléculas de este estudio, mostró valor pronóstico independiente para las clases moleculares, la edad, el estadio clínico, la expresión de Ki-67 y la expresión de vimentina (Tabla 17), con cocientes de riesgos (hazard ratio) de 0,8; 0,7; 3,5; 2,5 y 3,1 respectivamente. En el caso de la actina de músculo liso, aunque se obtuvo un valor de p estadísticamente significativo, el bajo número de casos valorables limita el significado del dato.

Variable	p (n*)	Hazard ratio	95% IC	
			Inferior	Superior
Clase molecular	0,047 (225)	0,803	,647	,997
Edad	0,003 (225)	0,708	,563	,891
Grado histológico	0,198 (225)	1,237	0,895	1,708
Estadio clínico	<0,001 (225)	3,527	2,332	5,333
EGFR	0,416 (225)	0,665	0,249	1,779
C-Kit	0,119 (196)	1,509	0,899	2,532
p63	0,584 (225)	1,143	0,709	1,841
Ki-67	<0,001 (225)	2,492	1,844	3,369
Survivina	0,914 (225)	1,032	0,586	1,815
ALDH-1	0,310 (225)	0,812	0,544	1,213
CD10	0,145 (71)	3,561	0,647	19,615
CK5/6	0,179 (225)	1,676	0,789	3,557
CK8/18	0,469 (225)	1,538	0,479	4,939
CK14	0,199 (196)	0,557	0,228	1,362
CK17	0,377 (196)	1,326	0,709	2,477
CK APM	0,444 (71)	1,483	0,540	4,073
Vimentina	<0,001 (225)	3,143	1,964	5,031
Cad E	0,554 (225)	1,134	0,749	1,716
Cad P	0,614 (225)	1,132	0,699	1,835
p120	0,552 (71)	0,570	0,090	3,632
Actina ml	0,014 (71)	27,296	1,973	377,631
Alfa-actina	0,368 (71)	0,369	0,042	3,230
Calponina	0,874 (196)	0,951	0,513	1,766

*n = número de casos incluidos en el análisis de cada variable

IC = Intervalo de confianza

Tablas 17. Análisis multivariante de la supervivencia global de las variables clínico-patológicas y las moléculas estudiadas.

5. DISCUSION

5. DISCUSIÓN

5.1. Clases moleculares

En el presente estudio se observó que el fenotipo molecular predominante fue el Luminal A, con el 42,4% (150 casos); el Luminal B representó el 20,3% (72 casos), con un total de 62,7% de casos luminales (222 casos, 67,6% de Luminal A y 32,4% de Luminal B). Estos porcentajes difieren de lo reportado por Blows y col. (89), en un estudio que incluye doce centros que comprenden más de diez mil casos, en donde refieren un total de 77% de casos luminales, repartidos en un 71% de casos Luminal A y un 6% de Luminal B. Solo en uno de los doce centros participativos en ese estudio se refieren porcentajes similares a los obtenidos en este trabajo, con un 42% de casos con fenotipo Luminal A y un 15% de casos con fenotipo Luminal B. En el resto de artículos los porcentajes oscilan entre 69 y 86% para la clase Luminal A y entre un 4 y 11% para la clase Luminal B. Es posible que estas diferencias se deban al método de clasificación utilizado, pues en varios de los trabajos incluidos en esa recopilación, solo consideran Luminal B a los casos que co-expresan receptores hormonales y HER2. Aun así el porcentaje global de casos luminales es alto en comparación con el de nuestro estudio, y pudiera explicarse en parte por el tipo de población incluida en esos estudios, con mayoría caucásica. En otros estudios como los de Carey y col. (90) y O'Brien y col. (91), que comparan a la población caucásica con la afroamericana, reportan para esta última porcentajes más parecidos a los de este trabajo, con 48 y 8% para los casos Luminal A y B respectivamente. Estudios hechos en otras partes del mundo con poblaciones no caucásicas, tales como el de Salhia y col. (92) en Egipto, reflejan porcentajes parecidos a los nuestros con un 44,3% para los casos Luminal A y un 24,6% para las mujeres con carcinoma con fenotipo Luminal B.

El 9% (32 casos) de los pacientes de este estudio correspondió a carcinomas de mama de tipo HER2, siendo este porcentaje comparable al publicado en los otros estudios (89-93). En

general, la tasa de casos HER2 está entre un 15 a 30%, aunque debe señalarse que en estos porcentajes se incluyen los casos que también tienen receptores hormonales positivos, que son clasificados molecularmente como Luminal B y, por tanto, no se consideran en la clase HER2 (41,43,94-97). Hoy en día se sabe que estos dos tipos de carcinoma son entidades diferentes y deben seguir siendo clasificadas separadamente (96,98).

En cuanto a los casos TN, basales y no basales juntos, el porcentaje fue de un 28,2% (100 casos), bastante mayor que la frecuencia en mujeres caucásicas, en quienes la media es de 16% (89), pero comparable con las cifras referidas en mujeres afroamericanas e hispánicas (90,91,99,100).

Estos datos sugieren que la población venezolana posiblemente tenga una distribución de las clases moleculares del cáncer de mama parecida a la de las mujeres afroamericanas y diferente a la población caucásica (99,100). En este estudio no se indagó expresamente la raza de las pacientes. Sin embargo, las mujeres que acuden al Instituto de Oncología de Valencia son en su gran mayoría de bajos recursos económicos y de raza predominantemente mestiza o hispana.

Las clases moleculares mostraron curvas de supervivencia similares a las descritas en los estudios pioneros de Perou y Sorlie (13,14,16), validados por la gran mayoría de las publicaciones posteriores. La clase molecular Luminal A presentó el mejor pronóstico con respecto a las otras clases moleculares. La clase Luminal B mostró una supervivencia intermedia y las clases HER2 y TN, peor pronóstico, con diferencias estadística significativas ($p < 0,001$), que se mantuvieron en el análisis multivariante.

5.2. Variables clínico-patológicas

En cuanto a las variables clínico-patológicas incluidas en este estudio, se observa que la edad media de las pacientes fue de 51,28 años, que concuerda con otras publicaciones en donde la

media está alrededor de los 50 años (101,102), difiriendo de otros trabajos como el de Bauer y col. (99), quien refiere en una extensa recopilación de más de cincuenta mil casos que la edad media de las pacientes fue de 54 años para la clase TN y de 60 años para las clases restantes. Esta diferencia se pudiera explicar nuevamente por la proporción de razas incluidas en los estudios. Llama la atención en nuestra serie el elevado porcentaje de casos de carcinoma de mama en mujeres por debajo de 50 años. La media de edad menor se presentó en las pacientes con carcinoma TN, lo cual también concuerda con la literatura (90,102).

La edad media y su distribución en grupos mostró diferencias estadísticamente significativas con las clases moleculares, al igual que ha sido demostrado en otros estudios, aunque la edad media para cada clase difiere levemente con la de las series publicadas (9,91,101,103-107), que señalan una edad media superior para las pacientes con carcinoma Luminal A y algo menor para las mujeres con TN.

La edad en grupos, tomada como univariable, mostró una supervivencia significativamente menor para las pacientes menores de 40 años, lo cual coincide también con lo publicado (90,108,109); en el análisis multivariante se mantuvo esta significación estadística.

La relación entre el estadio clínico y las clases moleculares estuvo cercana a la significación estadística ($p=0,078$). Así, se observa como en las clases Luminal B, HER2 y TN, es mayor la diferencia del estadio clínico III con el II, a favor del primero, mientras en los casos Luminal A se presentan casi con la misma frecuencia. Es posible que este hecho se deba al escaso número de pacientes en estadios clínicos I y IV incluidos en el estudio (9 y 17 respectivamente), estando la gran mayoría de los casos en los estadios II y III. En la literatura se ha publicado la asociación del fenotipo Luminal A con estadios clínicos iniciales, mientras que los carcinomas con fenotipo TN se presentan habitualmente en estadios clínicos más avanzados. Sin embargo, en los países desarrollados alrededor de un 80 a 90% de los casos de cáncer de mama se diagnostican en estadios clínicos I y II (90,93,95,99,110). El presente

trabajo refleja que en Venezuela el diagnóstico se realiza como promedio en un estadio clínico más avanzado.

En cuanto al grado histológico, la asociación con las clases moleculares fue estadísticamente significativa ($p < 0,001$), tal cual como lo señalan también la gran mayoría de las publicaciones (9,11,89,111). En la clase Luminal A predominaron los tumores bien y moderadamente diferenciados (grados I y II); en el grupo correspondiente a los tumores con fenotipo Luminal B el grado II; y en las clases HER2 y TN el grado III (poco diferenciado) fue el más frecuente. Esta asociación se ha explicado por el origen de la neoplasia a partir de una célula cancerosa más cercana o más alejada de la célula madre del epitelio ducto-lobulillar, mientras más primitiva sea la célula de origen, menos diferenciado será el tumor y mayor el grado histológico (112).

El estadio clínico y el grado histológico fueron variables con valor pronóstico significativo en los estudios univariantes, en concordancia con la mayoría de trabajos publicados (9,38,39,89,110,113-115). En el análisis multivariante el estadio clínico mantuvo su valor pronóstico a diferencia del grado histológico.

5.3. Marcadores y heterogeneidad tumoral

Los estudios inmunohistoquímicos (IHQ) del cáncer de mama revelan la expresión de determinadas proteínas en las células tumorales, por lo que se podrían considerar un reflejo válido de los estudios de biología molecular, así como una alternativa a los análisis de *microarrays* génicos o secuenciación genómica, todavía prohibitivos por el costo y la complejidad metodológica para su uso rutinario (27,90,93,116-119). Muchos autores han encontrado relación entre ambas, es decir, las clases moleculares según la expresión génica y la basada en la expresión de proteínas determinadas por IHQ. Entre ellos, en el año 2004, Nielsen y col. (27) utilizando un panel de cuatro anticuerpos (RE, HER2, EGFR y CK5/6)

observaron que existía una buena correlación entre el perfil génico y el perfil inmunohistoquímico. En otro estudio, la sensibilidad de la IHQ en la clasificación de los tumores fue de un 76% y la especificidad de un 100% (93). Sin embargo, no siempre la correlación es exacta ni extrapolable, más aun al utilizar muestras en parafina (107,120-122).

La tinción e interpretación de secciones tisulares completas ofrece ventajas sobre los estudios de matrices tisulares (TMA) a la hora de evaluar la posible heterogeneidad de un tumor, pero limitan el número de muestras a ser evaluadas. Además, la fijación y procedimientos de tinción varían de un caso a otro en la rutina clínica, al usarse diferentes compuestos químicos, anticuerpos y observadores, lo cual se minimiza al utilizar TMA (123,124). En este estudio se utilizó la IHQ para la clasificación molecular, siempre teniendo presente que no es lo mismo que los estudios génicos y que incluso estos últimos pueden presentar un alto grado de variabilidad y baja reproducibilidad interobservador (125,126).

Desde la publicación de Perou y Sorlie en el año 2000 (13), proponiendo la clasificación molecular del cáncer de mama, hemos asistido a una verdadera revolución en el campo de la patología mamaria, hasta el punto que en la actualidad prácticamente todas las publicaciones se refieren a ella. Sin embargo, después de cierto tiempo, quedó claro que esas clases moleculares no eran homogéneas y existían grupos híbridos o subtipos (37-42). Es así como por ejemplo Nicolau y col. (127) reportan un subtipo de carcinoma Luminal A que expresa altos niveles de c-MYC con bajos niveles de genes inflamatorios, asociado a un 100% de supervivencia y ausencia de metástasis; proponen que se clasifique como una clase molecular aparte llamada cáncer de mama c-MYC(+). Por su parte, Rody y col. (128) refieren que la presencia de numerosos linfocitos B y una baja actividad de IL-8 (interleuquina 8) en un tumor, define un subtipo de carcinoma TN con buen pronóstico. Laakso y col. (129) en el 2006 señalan que los casos con expresión tanto de marcadores luminales como basales deben constituir una clase aparte a la que denominan carcinoma basoluminal. La expresión de

proteínas relacionadas con las células basales/mioepiteliales no es exclusiva de la clase molecular TN, encontrándose ocasionalmente expresadas en otras clases moleculares (6,7,9). Algunos autores llaman basales a todos aquellos casos de carcinoma de mama que expresan proteínas relacionadas con las células basales, aunque expresen también ER, PR o HER2 (95,130,131). Otros autores llaman HER2-enriquecido a un grupo de tumores que puede tener expresión de receptores hormonales, o no expresar HER2 por IHQ, pero en los que se detecte por otro tipo de estudio, la expresión génica a nivel molecular (112). Recientemente se ha descrito un nuevo subtipo, llamado bajo en expresión de claudina o simplemente claudina-bajo, caracterizado por ser TN, por una baja expresión de proteínas de adhesión celular, como la cadherina E, relacionado con células madre cancerosas y que representaría el tipo de carcinoma de mama mas primitivo en cuanto a su origen celular. Prat y col. (132) proponen que este subtipo sea catalogado en un grupo diferente a las clases convencionales, así como también los TN no basales y los parecidos a mama normal (112,119,132). Para complicar más aún el problema, algunos autores como Kao y col. (133) proponen nuevos sistemas de clasificación en subtipos del I al VI, en base a la respuesta terapéutica a diferentes fármacos.

La discusión se plantea entre si es necesario crear nuevas clases moleculares, a medida que se identifican tipos de carcinomas con características génicas, moleculares y/o en cuanto a la expresión de nuevos marcadores diferentes a los grandes cuatro grupos reconocidos por la mayoría, o más bien se debe estratificar a los grupos ya validados.

La heterogeneidad del carcinoma de mama es un hecho bien reconocido y aceptado. Bajo el término global de cáncer de mama se incluyen tumores muy heterogéneos con diferentes características clínicas, evolutivas y respuesta a tratamientos específicos, a pesar de tener similitudes en el tipo histológico, grado y estadio. Esta variabilidad se ha tratado de explicar por el origen de las células madre cancerosas con potenciales evolutivos diferentes y un significativo número de alteraciones genéticas posibles, que se traduce en distintos patrones

de expresión de moléculas proteicas detectadas por inmunohistoquímica (35,36,134-136). Así, por ejemplo, no todas las pacientes con tumores que expresan RE responden al tratamiento hormonal de primera línea, mientras que otras recaen a pesar de una respuesta inicial (137).

Bertos y col. (134) en una revisión del año 2011, refieren que esta heterogeneidad en el cáncer de mama se produce a varios niveles. Existe heterogeneidad intratumoral, a nivel molecular en cuanto a la expresión génica, genómica, las células de origen, en el microambiente, en el macroambiente, durante la progresión del tumor y hasta en los sitios de las metástasis de acuerdo al tipo y subtipo molecular. Estos autores concluyen que: *“la identificación de las múltiples fuentes de la heterogeneidad tumoral tanto a nivel intrínseco como extrínseco, así como los cambios observados durante su progresión, sugieren que un mejor entendimiento de los efectos de esta heterogeneidad en el impacto de tratamientos específicos representa una necesidad clínica urgente. Esto permitirá el desarrollo de un set completo de clasificadores que puedan definir un tumor en particular dentro de un sistema coordinado multidimensional, que comprenda todas las variables que contribuyen a la heterogeneidad del cáncer de mama, generando un sistema de estratificación para predecir el beneficio de cada potencial intervención, o combinación de ellas, para definir los aspectos de un cáncer en particular”*.

En este estudio se verifica esta heterogeneidad tumoral al observar porcentajes de expresión muy variados para los 22 marcadores utilizados, entre 3,6% para el EGFR y 97,3% para la CK8/18.

5.3.1. Marcadores varios y de proliferación celular

El EGFR presentó positividad en muy pocos casos de esta serie, únicamente en el 3,6% (12 casos), muy por debajo de lo reportado en la literatura, que es de alrededor del 14% a 45% de todos los carcinomas y 25% a 70% en los de tipo basal (41,102,110,138-141). De esos 12

casos positivos 7 (58,3%) eran de la clase TN. Sin embargo, posiblemente por la baja frecuencia de positividad, la relación con las clases moleculares no presentó significación estadística. El EGFR constituyó en esta serie un factor de mal pronóstico, al presentar los casos con expresión positiva una supervivencia global significativamente menor que los casos negativos ($p=0,011$), significación estadística que no se mantuvo en el análisis multivariante. Blows y col (89), en su revisión de más de 10.000 casos, señalan que la presencia de los marcadores basales utilizados (EGFR y/o CK5/6) le confiere peor pronóstico a las clases Luminal A y TN.

La expresión positiva para las moléculas C-Kit, p63 y CD10 estuvo dentro del rango encontrado en otros estudios (47,49,102,138,142,143) (11,2%, 16% y 9,5% de casos positivos respectivamente). La expresión de C-Kit y de CD10 predominó en los casos TN, con relación estadísticamente significativa ($p<0,001$ y $p=0,028$), de acuerdo con las publicaciones consultadas (47,49,138,143). Igualmente, se observó asociación estadísticamente significativa de estos dos marcadores con la supervivencia global, siendo su expresión un factor pronóstico desfavorable. Esta relación no se mantuvo en el análisis multivariante.

En cambio, la expresión de p63 se observó en todas las clases moleculares, sin diferencia estadísticamente significativa en este estudio. Este es un hallazgo sorprendente, pues aunque se ha reportado su positividad en otras clases moleculares aparte de los tipos basales, ésta es siempre significativamente más baja que en ellos (28,138,144,145). Esta diferencia no se explica por el punto de corte utilizado, pues en la literatura consultada éste oscila del 1 a 5 % (28,102,138,140,145). Por otro lado, su expresión positiva si confirmó peor supervivencia a las pacientes ($p=0,014$), aunque al igual que los anteriores marcadores, sin significación en el análisis multivariante.

El índice de proliferación (Ki-67) presentó una relación estadísticamente significativa con las clases moleculares ($p < 0,001$), con índices proliferativos medios de 19,4%; 25,3%; 29,9% y 42,8% para las clases Luminal A, Luminal B, HER2 y TN respectivamente. Estos valores se encuentran cercanos a los valores de la mayoría de las publicaciones consultadas (124). En este estudio el índice de proliferación Ki-67 presentó significación pronóstica tanto en el análisis univariante como en el multivariante. En la literatura, el valor del índice de Ki-67 como factor pronóstico independiente es contradictorio, aunque las publicaciones más recientes coinciden en su importancia tanto para la clasificación, como para el pronóstico y selección del tratamiento más adecuado (94,96,146-150).

El punto de corte a utilizar para separar los tumores como de bajo o alto índice proliferativo es muy variado en la literatura médica. Hay autores como Choi y col. (41), que proponen establecer el punto de corte en el 10% de células positivas. Mientras que otros como Jacquemier y col. (151) usan el 20%. Sin embargo, fue el estudio de Cheang y col. (39) que marcó la pauta al establecer en un gran número de casos el 13,25% como punto para separar los casos Luminal A de los B. En esa misma publicación a efectos prácticos utilizan y recomiendan el punto de corte en un 14%. Basados en este hecho, Fasching y col. (124) aplican en un 13% su punto de corte y Goldhirsch y col. (96), en la reunión de consenso de St. Gallen del año 2011, establecen que el Ki-67 debe usarse de rutina en el panel de IHQ para la clasificación de los casos y el punto de corte recomendado es de 14%.

La survivina se expresó también en la mayoría de los casos, un 83,3%, en concordancia con lo publicado previamente (152-154). No presentó relación estadísticamente significativa con las clases moleculares ni presentó en este trabajo asociación con la supervivencia global. Hay algunas publicaciones como la de Lee y col. (58) que señalan una fuerte asociación de la expresión de survivina con los carcinomas basales y su expresión en ellos se relaciona con un peor pronóstico (152-154).

La expresión de ALDH-1 se observó en el 26,4% (79 casos) de los tumores estudiados. Olson y col. (155) reportan expresión de ALDH-1 en el 31% de los tumores analizados, Tanei y col. (156) en un 19%, Neumeister y col. (157) en el 7%, Ginestier y col. (158) en el 19% y 30% de los casos en dos series analizadas; finalmente Park y col. (36) encontraron la siguiente distribución de casos positivos de acuerdo al tipo molecular: 19% en los basales, 22% en HER2, 1% en Luminal A, y 6% en Luminal B. Los porcentajes de casos positivos de esta serie son comparables para los TN y HER2 (25,3% y 18,5%), mientras que para las clases luminales se encontraron porcentajes de expresión muy superiores (26,6% y 31,3%). Esta diferencia entre los trabajos no se explica solo por el punto de corte utilizado (10%), pues entonces también deberían tener menores porcentajes de positividad en los tipos HER2 y TN, a menos que en su serie no hubiera suficientes casos con expresión entre 1 y 10% para modificar la relación publicada. No se encontró asociación estadística con las clases moleculares ni con la supervivencia global en este estudio, datos que no concuerdan con otras publicaciones que refieren una significación negativa a su expresión, como marcador de la presencia de células madre cancerosas en el tumor, asociación con el tipo basal y resistencia a ciertos tratamientos (36,60,156-158).

5.3.2. Marcadores de filamentos intermedios

La CK8/18 resultó positiva en la mayoría de los casos (97,3%), como era de esperar. Posiblemente si se evaluara la proporción de células positivas estableciendo un punto de corte alto, como está reportado por Park y col. (36), en 80%, o en un 50% como Sarrio y col. (138) se encontrarían diferentes resultados. Kim y col. (87) utilizando un punto de corte en 1% describen resultados muy similares a este estudio, con 84% de positividad en los casos basales, y comentan que no consideraron a la CK8/18 como específica de diferenciación luminal. Es probable que sea correcta la explicación de Perou y col. (112), sobre el origen de los carcinomas basales en una célula menos primitiva y capaz de llevar a cabo una

diferenciación dual (basal y luminal), pero en donde predomina aun la diferenciación basal.

La CK5/6 es uno de los marcadores basales claves. Su expresión positiva se ha publicado entre 50-80% de los casos TN y en pocos casos de las clases moleculares Luminal A, Luminal B y HER2 (27,28,55,110,145,159-161). En el presente estudio solamente fue positiva en el 8% de los casos (26 casos) de los cuales 20 eran TN, lo cual representó el 21,5% de estos últimos. Esta asociación fue estadísticamente significativa ($p<0,001$) y presentó también valor pronóstico significativo con respecto a la supervivencia global en el estudio univariante ($p=0,007$), pero que no se mantuvo en el análisis multivariante. Obviamente, al estar relacionado con la clase TN, se asocia también a un peor pronóstico. A pesar de ello y de su utilidad en la separación de los TN basales de los no basales, en la reunión de consenso de St. Gallen (96) no recomiendan su uso en la rutina diaria, mientras no se logre asociar a una terapia específica.

Las CK14 y CK17 presentaron resultados similares, con expresión en un porcentaje bajo de casos, relacionadas con la clase TN y peor supervivencia global en el análisis univariante pero sin significación en el estudio multivariante. En la literatura el porcentaje de casos positivos para estas proteínas se encuentra entre un 20 a 40% de los casos basales y en escasos casos no TN, igualmente con un valor pronóstico desfavorable (87,102,110,138).

La CK APM, que es un coctel de citoqueratinas que incluye las CKs 1, 5, 10 y 14, fue expresada en el 65,5% de los casos examinados (112 casos), en mayor proporción en las clases de receptores hormonales negativos que en las clases luminales ($p=0,002$). Sin embargo, llama la atención su alto porcentaje de expresión en estos últimos, alrededor del 50% de los casos. Los casos positivos presentaron una supervivencia global menor que no fue estadísticamente significativa en los análisis univariante y multivariante. No encontramos referencias bibliográficas respecto al uso y relación de este marcador con las clases

moleculares. Es posible que hagan falta más estudios para llegar a conclusiones sobre su posible utilidad pronóstica y/o predictiva.

La vimentina se expresó en un número importante de casos, el 26,9% del total de casos, y aunque se encontró en todas las clases, estuvo principalmente relacionada a la clase TN, con expresión en el 67,1% de ellos ($p<0,001$). De la misma forma, presentó relación altamente significativa con la supervivencia global ($p<0,001$) tanto en el análisis univariante como en el multivariante. Algunas publicaciones describen que la vimentina no aumenta la sensibilidad para la identificación de los casos basales (71,102). Sin embargo, en esta serie sí resultó de utilidad ya que la expresión de CK5/6 y de EGFR fue baja.

La vimentina se encuentra relacionada en la literatura con el fenotipo basal en el carcinoma de mama (72,104,138,140), pero también se considera un indicador de la transición epitelio mesenquima (TEM), hecho que se considera un paso que favorece las metástasis (138,162-164). Esta TEM ha sido difícil de documentar y como explicación se han señalado varios argumentos, a saber: 1) una TEM incompleta puede ser suficiente para que las células produzcan metástasis; 2) La TEM puede ocurrir solamente en un pequeño número de células en un tumor, que rápidamente desaparecerían al trasvasarse en los vasos linfáticos o sanguíneos; 3) Después de la colonización, las células tumorales revierten el proceso, ocurriendo la transición mesenquimo epitelial. Un creciente número de evidencia sugiere que la TEM es responsable de la adquisición de resistencia terapéutica por parte de las células cancerosas, y en la generación de células con características de células madre y un alto potencial tumorigénico (162,165,166).

5.3.3. Marcadores de adhesión celular y del citoesqueleto

La expresión de cadherina E se observó conservada en la mayoría de los casos de esta serie, 73% de los tumores, tal como se esperaba. Los tumores de fenotipo TN presentaron un porcentaje elevado (42,9%) con expresión ausente o reducida, siendo esta diferencia

estadísticamente significativa con respecto a las otras clases moleculares. La pérdida de la expresión de cadherina E se considera un paso necesario de la TEM (74,162,164). No se apreció en la serie estudiada en este trabajo valor pronóstico significativo al analizar la SG a 5 años de las pacientes con tumores con ausencia o expresión reducida de cadherina E, a pesar de su asociación con los tumores TN y en general de una menor supervivencia media (no significativa estadísticamente). En otros estudios publicados si se ha encontrado valor pronóstico a la falta de expresión de esta molécula (75,100,110,115,138,167).

La cadherina P, por su parte, se expresó en el 40% de los casos, y aunque expresada en todas las clases, la proporción fue significativamente mayor en los casos TN ($p<0,001$), tal como lo indican varias publicaciones en especial en la revisión de Paredes y col. (79). Sarrio y col. (138) reportan alrededor de un 83% de positividad en los tumores de fenotipo basal y Rahka y col. (102) un 79%. En nuestro estudio la expresión de cadherina P presentó relación negativa con la supervivencia global en el estudio univariante ($p<0,001$), más no así en el análisis multivariante ($p=0,614$). En la revisión de Paredes se hace referencia a 2 series con valor pronóstico como variable independiente en el análisis multivariante. La expresión de cadherina P en el cáncer de mama es considerada también, al igual que la vimentina, como un marcador de la transición epitelio mesenquima (79,138).

La expresión de la proteína p120 o la ausencia/reducción de su expresión no presentó relación estadísticamente significativa con las clases moleculares o con la SG, en nuestro trabajo.

En cuanto a las actinas muscular lisa y alfa, se expresaron en muy pocos casos de esta serie, en relación, como se esperaba, con la clase molecular TN y relacionadas con la SG como factor de mal pronóstico. Las actinas son marcadores de células mioepiteliales, hay pocas publicaciones que hacen referencia a su asociación con las clases moleculares del cáncer de mama, la mayoría de ellas solo para hacer la diferencia entre tumores TN de tipo basal o de tipo no basal (81,102,138,168,169). Son necesarios más estudios para determinar su utilidad

práctica.

La calponina es un marcador de células mioepiteliales y es una proteína cuya expresión se ha relacionado con el carcinoma de tipo basal de la mama. Únicamente hemos encontrado un trabajo que describe la expresión positiva de calponina en el 54% de una serie de 33 casos de carcinoma metaplásico (170). La mayoría de las publicaciones se refieren a su utilidad en la identificación de células mioepiteliales (87,171,172). En este estudio se expresó en el 10,9% de los casos, distribuidos en todas las clases y sin relación con alguna de ellas. Sin embargo, sí presentó relación estadística significativa con la supervivencia global en el análisis univariable ($p=0,023$), con valor pronóstico desfavorable, el cual no se mantuvo en el estudio multivariante.

5.4. Clase molecular Luminal A y subtipos

Se encontraron dos grandes discriminantes de valor pronóstico de evolución en este grupo. El índice proliferativo determinado a través de la expresión de Ki-67 y la presencia de marcadores basales tales como CK5/6, calponina y vimentina. La importancia del índice proliferativo se ha reportado previamente como un factor pronóstico importante (38,39,66,173,174), tanto así que hasta se sugiere que aquellos casos con un índice mayor a 14% deben ser clasificados como Luminal B en lugar de Luminal A (39,150). En este estudio se observaron diferencias significativas en la evolución, tanto cuando el punto de corte era de un 14% como cuando era de un 25%.

De igual forma, al dividir los casos de este grupo en aquéllos que presentaron positividad o negatividad para cualquier otro marcador de tipo basal, se evidenció una mejor supervivencia, con diferencia significativa, para el grupo sin expresión de marcadores basales.

La expresión de estos marcadores basales en la categoría de los carcinomas Luminal A y el hallazgo de su relevancia pronóstica merece especial atención. Su expresión pudiera

explicarse ya sea bien porque en un clásico Luminal A se produzca una transformación epitelio-mesenquima y por ende de mayor capacidad metastásica, o de una población celular neoplásica mixta por diferenciación divergente de las células progenitoras o de células madre cancerosas diferentes (7,35,55,112,169,175-178). La gran mayoría de las publicaciones sobre la expresión de calponina y vimentina, refieren su relación con la clase TN, y de su importancia pronóstica, en especial de la vimentina, más no específicamente su significado cuando se expresan en otra clase molecular diferente a TN (71,72,104,138). La expresión de calponina y su relación con el pronóstico es un hallazgo que en nuestro conocimiento no se ha reportado, sin embargo, por la poca cantidad de casos positivos (11 casos) debe ser validado en series más grandes.

En conclusión, en relación con el Luminal A, se pueden establecer varios subgrupos de significado pronóstico, el grupo con expresión solo de RE y RP, con Ki-67 $\leq 14\%$, con mejor pronóstico, y los grupos de Luminal A con Ki-67 $\geq 15\%$, $>25\%$, o con expresión de otros marcadores basales, con peor pronóstico.

5.5. Clase molecular Luminal B y subtipos

En esta clase molecular la expresión de Ki-67 también demostró valor pronóstico, aunque el punto de corte que establece una diferencia fue de un 25%. En la literatura consultada el Ki-67 ha mostrado relevancia pronóstica y se ha utilizado para la clasificación de los casos catalogados como Luminal A (38,39,66,105,173), pero no se encontraron referencias en relación al grupo Luminal B y un punto de corte en esta clase.

En relación a los diferentes marcadores utilizados en este estudio, en el análisis univariable se evidenciaron diferencias significativas en la supervivencia global para CK17 (4 casos), EGFR (2 casos), C-Kit (3 casos) y cadherina P (22 casos). Dado el escaso número de casos positivos para estos marcadores, estos datos deben interpretarse con prudencia, aunque parece haber

una asociación significativa de la cadherina P con el pronóstico en este grupo, parece ser biológicamente relevante, aun cuando este marcador no mostró valor independiente en el análisis multivariable. La cadherina P es un marcador de la TEM, inversamente relacionado con la cadherina E e indicativo de mayor potencial metastásico, por tanto es lógico que se encuentre relacionado con peor pronóstico (79), aunque en la literatura se ha reportado en relación con los casos TN y no en las otras clases moleculares.

Los diferentes subtipos de esta clase, establecidos según la expresión de HER2 y de marcadores de tipo basal, no mostraron diferencias estadísticamente significativas en su supervivencia a los 5 años. Estos resultados contrastan con otros estudios que han reportado un peor pronóstico para los casos con expresión de HER2 (39,43,90,107).

5.6. Clase molecular HER2 y subtipos

El HER2 es por sí solo un factor de mal pronóstico, con supervivencia a los 5 años significativamente menor ($p=0,003$) para las pacientes que lo sobreexpresan. Esta diferencia posiblemente se deba a los casos positivos de la clase molecular HER2 y no a los casos positivos de la clase Luminal B, pues como se mencionó en el aparte anterior, no se apreciaron diferencias significativas en la clase molecular Luminal B en relación a la expresión de HER2. La clase molecular HER2 presentó una supervivencia a los 5 años significativamente menor que las clases lumbales, comparable al grupo de TN, tal como se ha señalado en la literatura, desde los trabajos de Perou y Sorlie (13,14) y validado por la gran mayoría de trabajos posteriores (41,102,110,115,141).

Con relación a la expresión de Ki-67 en este grupo, los resultados evidencian diferencias significativas ($p=0,006$), cuando el punto de corte se establece, al igual que en la clase Luminal A, tanto en un 14% como en un 25%, aunque debe señalarse que son pocos casos (6 tumores) con índice bajo de expresión de Ki-67. Este hallazgo no se ha encontrado descrito

en la literatura consultada.

Por otra parte, en esta clase no se encontraron diferencias significativas en la supervivencia en cuanto a la expresión o no de otros marcadores de tipo basal, al agrupar los casos que presentaban expresión de estos marcadores. Individualmente, sí se observaron diferencias significativas en la supervivencia con la expresión de p120 (un solo caso negativo de quince analizados), CK5/6 (un solo caso positivo de treinta analizados) y p63 (7 casos positivos de los 27 analizados). Igualmente, no se encontraron publicaciones que describieran resultados al respecto.

En conclusión, parece importante en esta clase molecular el índice de Ki-67 en relación al pronóstico. Sin embargo, en cuanto a la expresión de otros marcadores consideramos que fueron pocos el número de casos analizados y que hace falta estudiar series con mayor número de casos, ya que se trata de una clase molecular poco frecuente.

5.7. Clase molecular Triple Negativo (TN) y subtipos

Esta es la clase molecular que ha recibido mayor atención en la literatura, en parte por el mal pronóstico que tiene, así como por la ausencia de terapia específica, a diferencia de lo que ocurre con las otras clases moleculares. Inicialmente catalogada como Tipo Basal o parecida a basal (*basal-like*), recientemente ha quedado demostrado, tanto en la literatura publicada (6,41,55,72,102,110,141,143,161,179-181) como en este trabajo, que no todos los casos con el fenotipo triple negativo son de tipo basal, existiendo al menos dos grandes subtipos: TN con expresión de marcadores basales (TNB) y TN con ausencia de expresión de marcadores relacionados con el tipo basal (TNnB).

Para separar estos dos subtipos de TN, se han utilizado diferentes marcadores, siendo la CK5/6 y EGFR los usados por la mayoría de los grupos (41,141,143,161,179-181); otros trabajos se basan en la expresión, además, de otras citoqueratinas como la CK14 y CK17

(182,27,6,55,129,110,102); mientras otros estudios han descrito otra gran variedad de marcadores, entre ellos la vimentina, actina, p63, C-Kit, CD10, p120, calponina, ALDH1, BRCA1 y BRCA2 (del inglés “breast cáncer” 1 y 2) o cadherina P para su caracterización o para predecir el pronóstico en este grupo (28,60,71,72,138,144,145,160,183).

En cuanto a la expresión de Ki-67 en este grupo, la media de expresión fue de 42,84%, muy superior a la de los otros grupos, tal como señalan otros trabajos (38,184). Se observaron diferencias significativas en la supervivencia ($p < 0,001$) para los tres grupos de Ki-67, aunque con pocos casos en el grupo con un índice menor al 14%. En la literatura no se encontró referencia que establezca un punto de corte con valor pronóstico de Ki-67 para este grupo, el más cercano es la publicación de Fasching y col. (124) que indican que este punto de corte se encontraría entre un 30 a 40%. En nuestro trabajo el punto de corte se obtuvo en un 25%.

El análisis de la expresión de los marcadores relacionados con el fenotipo basal es interesante. En este estudio la CK5/6 solo se expresó en el 21,5% (20/93) de los casos triple negativo, un porcentaje sumamente inferior en relación a otros trabajos publicados cuyos porcentajes oscilan en general entre un 59 y 76% (27,28,55,144,145,159,160). El EGFR por su parte se expresó en el 7,2% (7/97) de los casos, cifra también mucho menor a lo generalmente descrito (27,28,72,102,140,161,184,185); lo cual indica que si en este trabajo se hubieran utilizado solo estos dos marcadores para definir al grupo TNB, el número de casos incluidos estaría muy por debajo de la realidad.

Los marcadores relacionados con el tipo basal que presentaron una asociación significativa con el grupo TN en este trabajo fueron: CK5/6, CD10, CK17, CK14, C-Kit, vimentina, CK APM, actina de músculo liso y alfa actina. Todo esto coincidiendo con lo publicado y es un hallazgo, por tanto, esperado (6,27,28,41,55,102,110,129,141,143-145,159-161,179-182). Sin embargo, la vimentina fue el marcador que individualmente presentó mayor utilidad, no solo para discriminar al subgrupo TNB, sino con relevancia pronóstica independiente ($p < 0,001$).

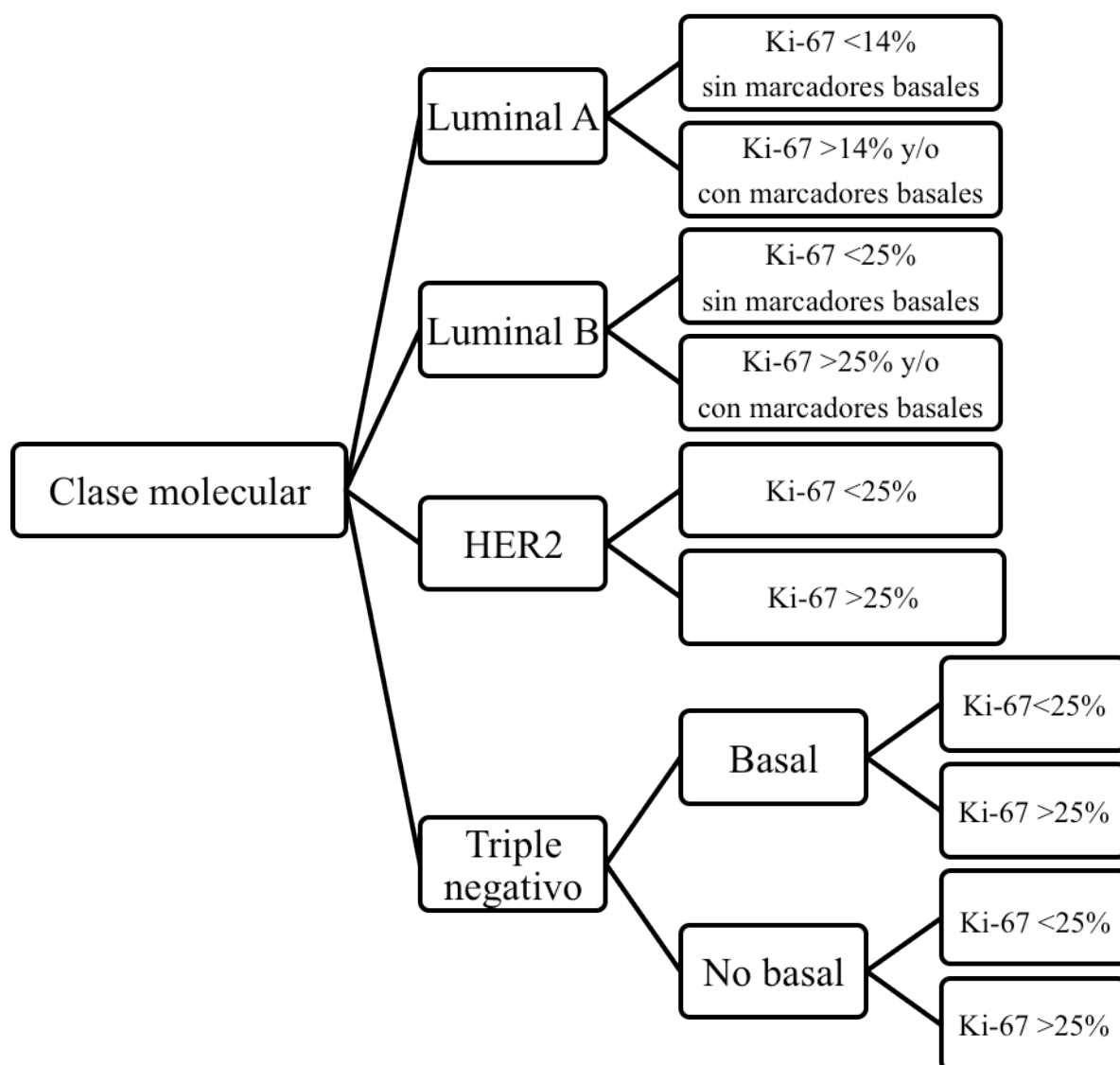
Este hallazgo se ha sugerido en algunos trabajos (7,28,72,104,138), aunque existe un trabajo en el cual la vimentina no aporta información adicional en cuanto a la caracterización del fenotipo basal (71). Consideramos que la vimentina puede ser relevante y práctica en el futuro, tanto para este grupo como cuando se expresa en otras clases moleculares.

En cuanto a la supervivencia, los marcadores que demostraron valor pronóstico individual en esta clase, fueron la cadherina P ($p=0,043$), la CK14 ($p=0,044$), CK17 ($p=0,046$) y C-Kit ($p=0,006$) y como ya se señaló, solo la vimentina mostró además valor pronóstico en el análisis multivariante.

Al agrupar los casos TN en aquéllos con expresión de marcadores basales *versus* aquéllos sin ella, la diferencia en la supervivencia global a 5 años fue altamente significativa ($p<0,001$), con pronóstico peor para el subtipo TNB, lo cual, como ha sido señalado ya en otros trabajos, destaca la importancia de esta subdivisión (6,41,55,72,102,110,141,143,161,179-181). Es de señalar que existe un trabajo publicado con una mejor supervivencia para el subtipo TNB que el TNnB (41).

En conclusión, para la clase de TN, es importante la determinación del Ki-67, con estratificación de los casos en un 25% (mejor pronóstico para aquéllos con un índice menor) y de acuerdo a la expresión de otros marcadores relacionados con el fenotipo basal. Sin embargo, como no resulta práctico realizar un gran número de reacciones de IHQ, tal vez con el uso de cuatro de ellos, CK5/6, y EGFR, tal como lo señala la literatura, y la inclusión de vimentina y cadherina P, se abarcaría a la gran mayoría de los casos TNB, además con un valor pronóstico.

Una vez clasificado cada caso en su respectiva clase molecular, pudiera utilizarse un nuevo grupo de marcadores de valor pronóstico para subclasificar el caso. Un modelo de subclasificación con el fin de obtener grupos de pronóstico diferente, que posiblemente requieran terapias diferentes, pudiera ser el siguiente esquema:



6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. En relación con la clase molecular Luminal A, se pueden establecer varios subgrupos de significado pronóstico: el subgrupo con expresión exclusiva de RE y RP, con Ki-67 $\leq 14\%$, con mejor pronóstico, y el subgrupo de Luminal A con Ki-67 $>14\%$, o con expresión de otros marcadores relacionados con el fenotipo basal.
2. El grupo Luminal B puede ser dividido en subtipos de acuerdo a la expresión de Ki-67 (punto de corte en el 25%) y de acuerdo a la expresión de cadherina P.
3. En la clase HER2, parece importante el índice de Ki-67 para el pronóstico, pero en cuanto a la expresión de otros marcadores consideramos que hace falta estudiar series con mayor número de casos, ya que al ser la clase menos frecuente y teniendo en cuenta las muestras no valorables en cada marcador, en este estudio se ha analizado un número bajo de casos.
4. La clase de TN puede ser dividida según el índice de proliferación en dos categorías pronósticas, con un mejor pronóstico para aquellos tumores con un Ki67 $<<25\%$. La combinación de CK5/6, EGFR y vimentina, detecta la gran mayoría de los casos TNB.
5. Las cuatro grandes clases moleculares del carcinoma de mama reconocidas, Luminal A, Luminal B, HER2 y TN, han demostrado su valor pronóstico al presentar diferencias significativas en su evolución.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Panamericana de Salud (O.P.S.). Programa especial de análisis de salud. Iniciativa de datos básicos en salud. Proceso de actualización datos. 2002. <http://www.ops-oms.org.ve/site/venezuela/ven-sit-salud-core.htm>
2. Smigal C, Jemal A, Ward E, Cokkinides V, Smith R, Howe HL, Thun M. Trends in breast cancer by race and ethnicity: Update 2006. *CA Cancer J Clin* 2006; 56:168-183.
3. World Health Organization, mortality database. <http://www.who.int/whosis/whosis/>
4. Hausauer AK, Keegan TH, Chang ET, Clarke CA. Recent breast cancer trends among Asian/Pacific Islander, Hispanic, and African-American women in the US: changes by tumor subtype. *Breast Cancer Res.* 2007;9:R90.
5. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer Statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; 60:277-300.
6. Gusterson BA, Ross DT, Heath VJ, Stein T. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2005; 7: 143-148.
7. Korsching E, Packeisen J, Liedtke C, Hungermann D, Wülfing P, van Diest PJ, et al. The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial-mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? *J Pathol* 2005; 206: 451-457.
8. Tavassoli FA, Devilee P. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. Lyon: IARCpress, 2003.
9. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res* 2010; 12:207.
10. Elston CW, Ellis IO: Pathological prognostic factors in breast cancer I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991, 19:403-410.
11. Lee AH, Ellis IO: The Nottingham prognostic index for invasive carcinoma of the breast. *Pathol Oncol Res* 2008; 14:113-115.
12. Pusztai L, Mazouni C, Anderson K, Wu Y, Symmans WF. Molecular classification of breast cancer: limitations and potential. *Oncologist* 2006; 11: 868-877.
13. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747-752.
14. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10869-10874.
15. Pusztai L, Ayers M, Stec J, Clark E, Hess K, Stivers D, et al. Gene expression profiles obtained from fine-needle aspirations of breast cancer reliably identify routine prognostic markers and reveal large-scale molecular differences between estrogen-negative and estrogen-positive tumors. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2406-2415.
16. Sørlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8418-8423.
17. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 10393-10398.

18. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5678-5685.
19. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347:1999-2009.
20. Desmedt C, Piette F, Loi S, Wang Y, Lallemand F, Haibe-Kains B, Viale G, et al. Strong time dependence of the 76-gene prognostic signature for node-negative breast cancer patients in the TRANSBIG multicenter independent validation series. *Clin Cancer Res.* 2007; 13:3207-3214.
21. Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, Sieuwerts AM, Look MP, Yang F, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 2005; 365:671-679.
22. Foekens JA, Atkins D, Zhang Y, Sweep FC, Harbeck N, Paradiso A, et al. Multicenter validation of a gene expression-based prognostic signature in lymph node-negative primary breast cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24:1665-1671.
23. Kelly CM, Krishnamurthy S, Bianchini G, Litton JK, Gonzalez-Angulo AM, Hortobagyi GN, et al. Utility of oncotype DX risk estimates in clinically intermediate risk hormone receptor-positive, HER2-normal, grade II, lymph node-negative breast cancers. *Cancer.* 2010; 116:5161-5167.
24. Tian S, Roepman P, Van't Veer LJ, Bernards R, de Snoo F, Glas AM. Biological functions of the genes in the mammaprint breast cancer profile reflect the hallmarks of cancer. *Biomark Insights* 2010; 5:129-5138.
25. Harbeck N, Thomssen C. A new look at node-negative breast cancer. *Oncologist.* 2011; 16 Suppl 1:51-60.
26. Gown AM. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol* 2008; 21 Suppl 2:S8-S15.
27. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5367-5374.
28. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* 2006; 19: 264-271.
29. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2329-2334.
30. Cariati M, Purushotham AD. Stem cells and breast cancer. *Histopathology* 2008; 52:99–107.
31. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Wicinski J, Cervera N, Finetti P, et al. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res* 2009; 69:1302–1313.
32. Rosen JM, Jordan CT. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science* 2009; 324:1670–1673.
33. Pandey PR, Saidou J, Watabe K. Role of myoepithelial cells in breast tumor progression. *Front Biosci* 2010; 15:226–236.
34. Katz E, Dubois-Marshall S, Sims AH, Gautier P, Caldwell H, et al. An in vitro model that recapitulates the epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human breast cancer. *PLoS ONE* 2011; 6: e17083.
35. Melchor L, Saucedo-Cuevas LP, Muñoz-Repeto I, Rodríguez-Pinilla SM, Honrado E, Campoverde A, et al. Comprehensive characterization of the DNA amplification at 13q34 in

- human breast cancer reveals TFDPI and CUL4A as likely candidate target genes. *Breast Cancer Res* 2009; 11:R86.
36. Park SY, Lee HE, Li H, Shipitsin M, Gelman R, Polyak K. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16:876-887.
 37. Anders CK, Carey LA. Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2009; 9 Suppl 2:S73-81.
 38. Bhargava R, Striebel J, Beriwal S, Flickinger JC, Onisko A, Ahrendt G, et al. Prevalence, morphologic features and proliferation indices of breast carcinoma molecular classes using immunohistochemical surrogate markers. *Int J Clin Exp Pathol* 2009; 2: 444-455.
 39. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 736-750.
 40. Loi S, Sotiriou C, Haibe-Kains B, Lallemant F, Conus NM, Piccart MJ, et al. Gene expression profiling identifies activated growth factor signaling in poor prognosis (Luminal-B) estrogen receptor positive breast cancer. *BMC Med Genomics* 2009; 2:37.
 41. Choi YL, Oh E, Park S, Kim Y, Park YH, Song K, et al. Triple-negative, basal-like, and quintuple-negative breast cancers: better prediction model for survival. *BMC Cancer* 2010; 10:507.
 42. Sircoulomb F, Bekhouche I, Finetti P, Adélaïde J, Ben Hamida A, Bonansea J, et al. Genome profiling of ERBB2-amplified breast cancers. *BMC Cancer* 2010; 10:539.
 43. Payne SJL, Bowen RL, Jones JL, Wells CA. Predictive markers in breast cancer – the present. *Histopathology* 2008; 52:966-978.
 44. Yu W, Kanaan Y, Bae YK, Gabrielson E. Chromosomal changes in aggressive breast cancers with basal-like features. *Cancer Genet Cytogenet* 2009; 193: 29-37.
 45. Agrawal A, Gutteridge E, Gee JM, Nicholson RI, Robertson JF. Overview of tyrosine kinase inhibitors in clinical breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12 Suppl 1:S135-144.
 46. Flynn JF, Wong C, Wu JM. Anti-EGFR Therapy: Mechanism and Advances in Clinical Efficacy in Breast Cancer. *J Oncol* 2009; 2009:526963.
 47. Tsutsui S, Yasuda K, Suzuki K, Takeuchi H, Nishizaki T, Higashi H, et al. A loss of c-kit expression is associated with an advanced stage and poor prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 2006; 94:1874–1878.
 48. Mol CD, Lim KB, Sridhar V, Zou H, Chien EY, Sang BC, et al. Structure of a c-kit product complex reveals the basis for kinase transactivation. *J Biol Chem*. 2003; 278:31461-31464.
 49. Charpin C, Giusiano S, Charfi S, Secq V, Carpentier S, Andrac L, et al. Quantitative immunohistochemical expression of c Kit in breast carcinomas is predictive of patients' outcome. *Br J Cancer* 2009; 101:48-54.
 50. Yang A, Kaghad M, Wang G, Gillet E, Fleming MD, Dotsch V, et al. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* 1998; 2:305-316.
 51. Barbareschi M, Pecciarini L, Cangi MG, Macrì E, Rizzo A, Viale G, et al. p63, a p53 homologue, is a selective nuclear marker of myoepithelial cells of the human breast. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 1054-1060.
 52. Wang X, Mori I, Tang W, Nakamura M, Nakamura Y, Sato M, et al. p63 expression in normal, hyperplastic and malignant breast tissues. *Breast Cancer* 2002; 9:216-219.
 53. Di Como CJ, Urist MJ, Babayan I, Drobnjak M, Hedvat CV, Teruya-Feldstein J, et al. p63 expression profiles in human normal and tumor tissues. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 494-501.
 54. Stefanou D, Batistatou A, Nonni A, Arkoumani E, Agnantis NJ. p63 expression in benign and malignant breast lesions. *Histol Histopathol* 2004; 19: 465-471.

55. Laakso M, Loman N, Borg A, Isola J. Cytokeratin 5/14-positive breast cancer: true basal phenotype confined to BRCA1 tumors. *Mod Pathol* 2005; 18: 1321-1328.
56. Murray-Zmijewski F, Lane DP, Bourdon JC. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ* 2006; 13:962-972.
57. Gritsko T, Williams A, Turkson J, Kaneko S, Bowman T, Huang M, et al. Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 2006; 12:11-19.
58. Lee CW, Simin K, Liu Q, Plescia J, Guha M, Khan A, et al. A functional Notch-survivin gene signature in basal breast cancer. *Breast Cancer Res* 2008; 10:R97.
59. Penumatsa K, Edassery SL, Barua A, Bradaric MJ, Luborsky JL. Differential expression of aldehyde dehydrogenase 1a1 (ALDH1) in normal ovary and serous ovarian tumors. *J Ovarian Res* 2010; 3:28.
60. Nalwoga H, Arnes JB, Wabinga H, Akslen LA. Expression of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) is associated with basal-like markers and features of aggressive tumours in African breast cancer. *Br J Cancer* 2010; 102:369-75.
61. Resetkova E, Reis-Filho JS, Jain RK, Mehta R, Thorat MA, Nakshatri H, Badve S. Prognostic impact of ALDH1 in breast cancer: a story of stem cells and tumor microenvironment. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 123:97-108.
62. Toussaint J, Durbecq V, Altintas S, Doriath V, Rouas G, Paesmans M, et al. Low CD10 mRNA expression identifies high-risk ductal carcinoma in situ (DCIS). *PLoS One* 2010; 5. pii: e12100.
63. Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991; 138: 867-873.
64. Roa JC. Marcadores moleculares: proliferación celular e inestabilidad microsatelital. *Gastr Latinoam* 2003; 14:195-199.
65. Gerdes J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Semin Cancer Biol* 1990; 1:199-206.
66. de Azambuja E, Cardoso F, De Castro G, Colozza M, Mano MS et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12155 patients. *Br J Cancer* 2007; 96:1504–1513.
67. Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, Langbein L, Lane EB, Magin TM, et al. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol* 2006; 174:169-174.
68. Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol* 2008; 129:705-733.
69. Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 2002; 40:403-439.
70. Eriksson JE, Dechat T, Grin B, Helfand B, Mendez M, Pallari HM, Goldman RD. Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J Clin Invest.* 2009; 119:1763-1771.
71. Kusinska RU, Kordek R, Pluciennik E, Bednarek AK, Piekarski JH, Potemski P. Does vimentin help to delineate the so-called 'basal type breast cancer'? *J Exp Clin Cancer Res* 2009; 28:118.
72. Rodríguez-Pinilla SM, Sarrió D, Honrado E, Moreno-Bueno G, Hardisson D, Calero F, et al. Vimentin and laminin expression is associated with basal-like phenotype in both sporadic and BRCA1-associated breast carcinomas. *J Clin Pathol* 2007; 60: 1006-1012.
73. Qin Z, Kreplak L, Buehler MJ. Hierarchical structure controls nanomechanical properties of vimentin intermediate filaments. *PLoS One* 2009; 4:e7294.

74. Baranwal S, Alahari SK. Molecular mechanisms controlling E-cadherin expression in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 384:6-11.
75. Koo JS, Jung W, Jeong J. The predictive role of E-cadherin and androgen receptor on in vitro chemosensitivity in triple-negative breast Cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2009; 39:560-568.
76. Shibata T, Kokubu A, Sekine S, Kanai Y, Hirohashi S. Cytoplasmic p120ctn regulates the invasive phenotypes of E-cadherin-deficient breast cancer. *Am J Pathol* 2004; 164:2269-2278.
77. Dabbs DJ, Bhargava R, Chivukula M. Lobular versus ductal breast neoplasms. The diagnostic utility of p120 catenin. *Am J Surg Pathol* 2007; 31:427-437.
78. Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. Cadherin switching. *J Cell Sci* 2008; 121:727-735.
79. Paredes J, Correia AL, Ribeiro AS, Albergaria A, Milanezi F, Schmitt FC. P-cadherin expression in breast cancer: a review. *Breast Cancer Res* 2007; 9:214.
80. Gamallo C, Moreno-Bueno G, Sarrió D, Calero F, Hardisson D, Palacios J. The prognostic significance of P-cadherin in infiltrating ductal breast carcinoma. *Mod Pathol*. 2001; 14:650-654.
81. Sousa B, Paredes J, Milanezi F, Lopes N, Martins D, Dufloth R, et al. P-cadherin, vimentin and CK14 for identification of basal-like phenotype in breast carcinomas: an immunohistochemical study. *Histol Histopathol* 2010; 25:963-974.
82. Esposito NN, Chivukula M, Dabbs DJ. The ductal phenotypic expression of the E-cadherin/catenin complex in tubulolobular carcinoma of the breast: an immunohistochemical and clinicopathologic study. *Mod Pathol*. 2007; 20:130-138.
83. Reynolds AB. p120-catenin: Past and present. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773:2-7.
84. Pfaendtner J, Lyman E, Pollard TD, Voth GA. Structure and dynamics of the actin filament. *J Mol Biol* 2010; 396:252-63.
85. Hild G, Bugyi B, Nyitrai M. Conformational dynamics of actin: effectors and implications for biological function. *Cytoskeleton* 2010; 67:609-629.
86. Adriance MC, Inman JL, Petersen OW, Bissell MJ. Myoepithelial cells: good fences make good neighbors. *Breast Cancer Res* 2005; 7:190-197.
87. Kim HR, Appel S, Vetterkind S, Gangopadhyay SS, Morgan KG. Smooth muscle signalling pathways in health and disease. *J Cell Mol Med* 2008; 12:2165-2180.
88. Niwińska A, Olszewski W, Murawska M, Pogoda K. Triple-negative breast cancer with brain metastases: a comparison between basal-like and non-basal-like biological subtypes. *J Neurooncol* 2011; 105:547-553.
89. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med* 2010; 7:e1000279.
90. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006; 295: 2492-2502.
91. O'Brien KM, Cole SR, Tse CK, Perou CM, Carey LA, Foulkes WD, et al. Intrinsic breast tumor subtypes, race, and long-term survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Clin Cancer Res* 2010; 16:6100-6110.
92. Salhia B, Tapia C, Ishak EA, Gaber S, Berghuis B, Hussain KH, Duquette RA, Resau J, Carpten J. Molecular subtype analysis determines the association of advanced breast cancer in Egypt with favorable biology. *BMC Womens Health*. 2011; 11:44.
93. Irigoyen MA, García FV, Iturriagagoitia AC, Beroiz BI, Martínez MS, Grima FG. Molecular subtypes of breast cancer: prognostic implications and clinical and immunohistochemical characteristics]. *An Sist Sanit Navar*. 2011; 34:219-233.

94. Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Relat Cancer*. 2010; 17:R245-62.
95. Carey LA. Directed Therapy of Subtypes of Triple-Negative Breast Cancer. *The Oncologist* 2011;16(suppl 1):71–78.
96. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 2011; 22:1736-1747.
97. Tsang RY, Finn RS. Beyond trastuzumab: novel therapeutic strategies in HER2-positive metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 2012; 106:6-13.
98. Emde A, Mahlknecht G, Maslak K, Ribba B, Sela M, Possinger K, Yarden Y. Simultaneous Inhibition of Estrogen Receptor and the HER2 Pathway in Breast Cancer: Effects of HER2 Abundance. *Transl Oncol* 2011; 4:293-300.
99. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer* 2007; 109: 1721-1728.
100. Hudis CA, Gianni L. Triple-negative breast cancer: an unmet medical need. *Oncologist* 2011; 16 Suppl 1:1-11.
101. Park SY, Kwon HJ, Choi Y, Lee HE, Kim SW, Kim JH, et al. Distinct patterns of promoter CpG island methylation of breast cancer subtypes are associated with stem cell phenotypes. *Mod Pathol* 2012; 25:185-196.
102. Rakha EA, Elsheikh SE, Aleskandarany MA, Habashi HO, Green AR, Powe DG, et al. Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. *Clin Cancer Res* 2009; 15:2302-2310.
103. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J, et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98:262-272.
104. Chen MH, Yip GW, Tse GM, Moriya T, Lui PC, Zin ML, et al. Expression of basal keratins and vimentin in breast cancers of young women correlates with adverse pathologic parameters. *Mod Pathol* 2008; 21:1183-1191.
105. Webster LR, Lee SF, Ringland C, Morey AL, Hanby AM, Morgan G, et al. Poor-prognosis estrogen receptor-positive breast cancer identified by histopathologic subclassification. *Clin Cancer Res* 2008; 14:6625-6633.
106. Kwan ML, Kushi LH, Weltzien E, Maring B, Kutner SE, Fulton RS, et al. Epidemiology of breast cancer subtypes in two prospective cohort studies of breast cancer survivors. *Breast Cancer Res* 2009; 11:R31.
107. Raica M, Jung I, Cîmpean AM, Suciu C, Mureșan AM. From conventional pathologic diagnosis to the molecular classification of breast carcinoma: are we ready for the change? *Rom J Morphol Embryol* 2009; 50:5-13.
108. Oh JL, Bonnen M, Outlaw ED, et al. The impact of young age on locoregional recurrence after doxorubicin-based breast conservation therapy in patients 40 years old or younger: How young is “young”? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 65:1345–1352.
109. Beadle BM, Woodward WA, Buchholz TA. The impact of age on outcome in early-stage breast cancer. *Semin Radiat Oncol* 2011; 21:26-34.
110. Lerma E, Barnadas A, Prat J. Triple negative breast carcinomas: similarities and differences with basal like carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2009; 17:483-494.

111. Albergaria A, Ricardo S, Milanezi F, Carneiro V, Amendoeira I, Vieira D, et al. Nottingham Prognostic Index in triple-negative breast cancer: a reliable prognostic tool? *BMC Cancer* 2011; 11:299.
112. Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist* 2010; 15 Suppl 5:39-48.
113. D'Eredita G, Giardina C, Martellotta M, Natale T, Ferrarese F. Prognostic factors in breast cancer: the predictive value of the Nottingham Prognostic Index in patients with a long-term follow-up that were treated in a single institution. *Eur J Cancer* 2001; 37:591-596.
114. Makretsov NA, Hayes M, Carter BA, Dabiri S, Gilks CB, Huntsman DG. Stromal CD10 expression in invasive breast carcinoma correlates with poor prognosis, estrogen receptor negativity, and high grade. *Mod Pathol* 2007; 20:84-89.
115. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist* 2009; 14:320-368.
116. Rakha EA, El-Rehim DA, Paish C, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Blamey RW, Macmillan D, Ellis IO. Basal phenotype identifies a poor prognostic subgroup of breast cancer of clinical importance. *Eur J Cancer* 2006; 42:3149-3156.
117. Mullins M, Perreard L, Quackenbush JF, Gauthier N, Bayer S, Ellis M, et al. Agreement in breast cancer classification between microarray and quantitative reverse transcription PCR from fresh-frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Clin Chem* 2007; 53:1273-1279.
118. Barry WT, Kernagis DN, Dressman HK, Griffis RJ, Hunter JD, Olson JA, et al. Intratumor heterogeneity and precision of microarray-based predictors of breast cancer biology and clinical outcome. *J Clin Oncol* 2010; 28:2198-2206.
119. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther* 2010; 10:955-960.
120. Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Bertucci F, Eisinger F, Geneix J, Bechlian D, et al. Distinct and complementary information provided by use of tissue and DNA microarrays in the study of breast tumor markers. *Am J Pathol* 2002; 161:1223-1233.
121. Lusa L, McShane LM, Reid JF, De Cecco L, Ambrogi F, Biganzoli E, et al. Challenges in projecting clustering results across gene expression-profiling datasets. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99:1715-1723.
122. Schobesberger M, Baltzer A, Oberli A, Kappeler A, Gugger M, Burger H, et al. Gene expression variation between distinct areas of breast cancer measured from paraffin-embedded tissue cores. *BMC Cancer* 2008; 8:343.
123. Liedtke C, Wang J, Tordai A, Symmans WF, Hortobagyi GN, Kiesel L, et al. Clinical evaluation of chemotherapy response predictors developed from breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 121:301-309.
124. Fasching PA, Heusinger K, Haeberle L, Niklos M, Hein A, Bayer CM, et al. Ki67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. *BMC Cancer* 2011; 11:486.
125. Cianfrocca M, Gradishar W. New molecular classifications of breast cancer. *CA Cancer J Clin* 2009; 59:303-313.
126. Mackay A, Weigelt B, Grigoriadis A, Kreike B, Natrajan R, A'Hern R, et al. Microarray-based class discovery for molecular classification of breast cancer: analysis of interobserver agreement. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103:662-673.
127. Nicolau M, Levine AJ, Carlsson G. Topology based data analysis identifies a subgroup of breast cancers with a unique mutational profile and excellent survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108:7265-7270.

- 128.Rody A, Karn T, Liedtke C, Pusztai L, Ruckhaeberle E, Hanker L, et al. A clinically relevant gene signature in triple negative and basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res* 2011; 13:R97.
- 129.Laakso M, Tanner M, Nilsson J, Wiklund T, Erikstein B, Kellokumpu-Lehtinen P, et al. Basoluminal carcinoma: a new biologically and prognostically distinct entity between basal and luminal breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12:4185-4191.
- 130.Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Paish EC, Powe DG, Gee J, et al. Biologic and clinical characteristics of breast cancer with single hormone receptor positive phenotype. *J Clin Oncol* 2007; 25:4772-4778.
- 131.Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V, et al. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod Pathol* 2011; 24:157-167.
- 132.Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010; 12:R68.
- 133.Kao KJ, Chang KM, Hsu HC, Huang AT. Correlation of microarray-based breast cancer molecular subtypes and clinical outcomes: implications for treatment optimization. *BMC Cancer* 2011; 11:143.
134. Bertos NR, Park M. Breast cancer - one term, many entities? *J Clin Invest* 2011; 121:3789-3796.
- 135.Munirah MA, Siti-Aishah MA, Reena MZ, Sharifah NA, Rohaizak M, Norlia A, et al. Identification of different subtypes of breast cancer using tissue microarray. *Rom J Morphol Embryol* 2011; 52:669-677.
- 136.Reis-Filho JS, Pusztai L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet* 2011; 378:1812-1823.
137. Johnston SR. New strategies in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16:1979-1987.
- 138.Sarrió D, Rodríguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res* 2008; 68: 989-997.
139. Gluz O, Liedtke C, Gottschalk N, Pusztai L, Nitz U, Harbeck N. Triple-negative breast cancer--current status and future directions. *Ann Oncol* 2009; 20:1913-1927.
- 140.Carvalho FM, Bacchi LM, Santos PP, Bacchi CE. Triple-negative breast carcinomas are a heterogeneous entity that differs between young and old patients. *Clinics (Sao Paulo)* 2010; 65:1033-1036.
- 141.de Ruijter TC, Veeck J, de Hoon JP, van Engeland M, Tjan-Heijnen VC. Characteristics of triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011; 137:183-192.
- 142.Leong SP, Shen ZZ, Liu TJ, Agarwal G, Tajima T, Paik NS, et al. Is breast cancer the same disease in Asian and Western countries? *World J Surg* 2010; 34:2308-2324.
- 143.Reis-Filho JS, Tutt AN. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology* 2008; 52: 108-118.
- 144.Hasegawa M, Moritani S, Murakumo Y, Sato T, Hagiwara S, Suzuki C, et al. CD109 expression in basal-like breast carcinoma. *Pathol Int* 2008; 58: 288-294.
- 145.Reigosa A, Fernández A, Gutiérrez D, Caleiras E, Hardisson D, Espig H, et al. Expresión de p63 y citoqueratina 5/6 en los diferentes tipos moleculares del carcinoma de mama. *Rev Esp Patol* 2010; 43:79-85.
- 146.Wirapati P, Sotiriou C, Kunkel S, Farmer P, Pradervand S, Haibe-Kains B, et al. Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast Cancer Res* 2008; 10:R65.

147. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast* 2008; 17:323-334.
148. Klintman M, Bendahl PO, Grabau D, Lövgren K, Malmström P, Fernö M; South Sweden Breast Cancer Group. The prognostic value of Ki67 is dependent on estrogen receptor status and histological grade in premenopausal patients with node-negative breast cancer. *Mod Pathol* 2010; 23:251-259.
149. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol* 2010; 11:174-183.
150. Piccart-Gebhart MJ. New developments in hormone receptor-positive disease. *Oncologist* 2011; 16 Suppl 1:40-50.
151. Jacquemier J, Charafe-Jauffret E, Monville F, Esterni B, Extra JM, Houvenaeghel G, Xerri L, Bertucci F, Birnbaum D. Association of GATA3, P53, Ki67 status and vascular peritumoral invasion are strongly prognostic in luminal breast cancer. *Breast Cancer Res* 2009; 11:R23.
152. Chu JS, Shew JY, Huang CS. Immunohistochemical analysis of survivin expression in primary breast cancers. *J Formos Med Assoc* 2004; 103:925-931.
153. Hinnis AR, Luckett JC, Walker RA. Survivin is an independent predictor of short-term survival in poor prognostic breast cancer patients. *Br J Cancer* 2007; 96:639-645.
154. Nassar A, Lawson D, Cotsonis G, Cohen C. Survivin and caspase-3 expression in breast cancer: correlation with prognostic parameters, proliferation, angiogenesis, and outcome. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2008; 16:113-120.
155. Olsson E, Honeth G, Bendahl PO, Saal LH, Gruvberger-Saal S, Ringnér M, et al. CD44 isoforms are heterogeneously expressed in breast cancer and correlate with tumor subtypes and cancer stem cell markers. *BMC Cancer* 2011; 11:418.
156. Tanei T, Morimoto K, Shimazu K, Kim SJ, Tanji Y, Taguchi T, et al. Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin Cancer Res* 2009; 15:4234-4241.
157. Neumeister V, Agarwal S, Bordeaux J, Camp RL, Rimm DL. In situ identification of putative cancer stem cells by multiplexing ALDH1, CD44, and cytokeratin identifies breast cancer patients with poor prognosis. *Am J Pathol* 2010; 176:2131-2138.
158. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 2007; 1:555-567.
159. Banerjee S, Reis-Filho JS, Ashley S, Steele D, Ashworth A, Lakhani SR, et al. Basal-like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy. *J Clin Pathol* 2006; 59: 729-735.
160. Kreike B, van Kouwenhove M, Horlings H, Weigelt B, Peterse H, Bartelink H, et al. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res* 2007; 9: R65.
161. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res* 2008; 14:1368-1376.
162. Shapiro IM, Cheng AW, Flytzanis NC, Balsamo M, Condeelis JS, Oktay MH, et al. An EMT-driven alternative splicing program occurs in human breast cancer and modulates cellular phenotype. *PLoS Genet* 2011; 7:e1002218.
163. Toft DJ, Cryns VL. Minireview: Basal-like breast cancer: from molecular profiles to targeted therapies. *Mol Endocrinol* 2011; 25:199-211.

164. May CD, Sphyris N, Evans KW, Werden SJ, Guo W, Mani SA. Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: a dangerously dynamic duo in breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 2011; 13:202.
165. Creighton CJ, Li X, Landis M, Dixon JM, Neumeister VM, Sjolund A, et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:13820-13825.
166. Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:265-273.
167. Sontrop HM, Verhaegh WF, Reinders MJ, Moerland PD. An evaluation protocol for subtype-specific breast cancer event prediction. *PLoS One* 2011; 6:e21681.
168. Piechocki MP, Dibbely SK, Lonardo F, Yoo GH. Gefitinib prevents cancer progression in mice expressing the activated rat HER2/neu. *Int J Cancer* 2008; 122:1722-1729.
169. Katz E, Dubois-Marshall S, Sims AH, Gautier P, Caldwell H, Meehan RR, Harrison DJ. An in vitro model that recapitulates the epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human breast cancer. *PLoS One* 2011; 6:e17083.
170. Yilmaz KB, Pak I, Irkkan C, Ozaslan C, Atalay C. Metaplastic carcinoma of the breast: Clinicopathological features and immunohistochemical analysis. *J BUON*. 2011; 16:652-656.
171. Moriya T, Kanomata N, Kozuka Y, Hirakawa H, Kimijima I, Kimura M, et al. Molecular morphological approach to the pathological study of development and advancement of human breast cancer. *Med Mol Morphol* 2010; 43:67-73.
172. Dewar R, Fadare O, Gilmore H, Gown AM. Best practices in diagnostic immunohistochemistry: myoepithelial markers in breast pathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2011; 135:422-429.
173. Bánkfalvi A, Ludwig A, De-Hesselle B, Buerger H, Buchwalow IB, Boecker W. Different proliferative activity of the glandular and myoepithelial lineages in benign proliferative and early malignant breast diseases. *Mod Pathol* 2004; 17:1051-1061.
174. Webster TF, Hoffman K, Weinberg J, Vieira V, Aschengrau A. Community- and individual-level socioeconomic status and breast cancer risk: multilevel modeling on Cape Cod, Massachusetts. *Environ Health Perspect* 2008; 116:1125-1129.
175. Böcker W, Moll R, Poremba C, Holland R, van Diest PJ, Dervan P, et al. Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. *Lab Invest* 2002; 82:737-745.
176. Boecker W, Buerger H. Evidence of progenitor cells of glandular and myoepithelial cell lineages in the human adult female breast epithelium: a new progenitor (adult stem) cell concept. *Cell Prolif* 2003; 36: 73-84.
177. Trihia H, Murray S, Price K et al. Ki-67 expression in breast carcinoma: its association with grading systems, clinical parameters, and other prognostic factors a surrogate marker? *Cancer* 2003; 97:1321-1331.
178. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 2006; 66: 9339-9344.
179. Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Birnbaum D. Prognostic classification of breast cancer and gene expression profiling. *Med Sci (Paris)* 2008; 24:599-606.
180. Fadare O, Tavassoli FA. The phenotypic spectrum of basal-like breast cancers: a critical appraisal. *Adv Anat Pathol* 2007; 14:358-373.
181. Anders CK, Johnson R, Litton J, Phillips M, Bleyer A. Breast cancer before age 40 years. *Semin Oncol* 2009; 36:237-249.

182. Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, Bell J, Blamey RW, Robertson JF, et al. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol.* 2004; 203: 661-671.
183. Honrado E, Benítez J, Palacios J. Histopathology of BRCA1- and BRCA2-associated breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; 59:27-39.
184. Umemura S, Takekoshi S, Susuki Y, Saitoh Y, Tozuda Y, Osamura RY. Estrogen receptor-negative and human epidermal growth factor receptor 2-negative breast cancer tissue have the highest Ki-67 labeling index and EGFR expression: gene amplification does not contribute to EGFR expression. *Oncol Rep* 2005; 14:337-343.
185. Chi P, Allis CD, Wang GG. Covalent histone modifications--miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10:457-469.